

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
"FEDERICO II"**



**Dottorato di Ricerca in Morfologia Clinica e Patologica
XXI ciclo
Coordinatore prof. S. Montagnani**

TESI DI DOTTORATO

***Analisi di marcatori apoptotici nell'ischemia cardiaca mediante
tissue microarray***

Relatore

Prof. Stefania Montagnani

Dottorando

Dott. Diego Calabrese

ANNO ACCADEMICO 2007-2008

Indice

Indice	2
Sommario	3
Introduzione	5
Anatomia microscopica e macroscopica del cuore	5
Vasi coronari ed irrorazione del cuore	9
Descrizione della patologia ischemica	10
Eventi molecolari caratterizzanti l'ischemia cardiaca.....	15
Danni durante la riperfusione	16
ROS, superossido dismutasi e meccanismi di protezione cellulare	18
Materiali e metodi	26
Selezione dei campioni.....	26
Analisi dei campioni e fasi preliminari di messa a punto del sistema sperimentale	27
Preparazioni istologiche	28
<i>Campionamento</i>	28
<i>Fissazione</i>	29
<i>Disidratazione, chiarificazione ed inclusione</i>	31
Realizzazione di TMA	33
<i>Sezionamento</i>	35
Anticorpi.....	36
IHC	37
Valutazione ed analisi statistica dei TMA.....	39
Assegnazione degli score per le variabili biometriche e patologiche	40
RT-PCR.....	41
Prelievo e scelta dei campioni.....	42
Estrazione e purificazione di RNA totale.....	43
Analisi quantitativa e qualitativa dell'RNA estratto	46
Sintesi di cDNA (retrotrascrizione).....	48
Oligonucleotidi e programmi di PCR.....	51
PCR (Polymerase Chain Reaction)	51
Analisi dei prodotti di PCR attraverso elettroforesi su gel di agarosio.....	55
Risultati	57
Discussione.....	62
Limiti dello studio	67
Prospettive di studio	67
Iconografia	69
Bibliografia.....	80
Testi consultati	88

Sommario

L'infarto miocardico è una patologia causata dalla morte o necrosi di una zona di miocardio, dovuta all'improvvisa occlusione di uno o più rami delle arterie coronarie.

Questa condizione morbosa, contro la quale la scienza medica lotta ogni giorno di più, rappresenta oggi la più frequente fra le cause di morte ed è in costante aumento.

L'aumento dell'incidenza di tale patologia è legata al cambiamento dello stile di vita nelle nazioni industrializzate. Lo stress, il cambiamento delle abitudini alimentari che prediligono un'alimentazione più ricca di grassi e proteine rispetto al passato e le abitudini sempre più sedentarie, concorrono nell'incremento del rischio di infarto in tali popolazioni.

I ROS (*Reactive Oxygen Species*) sono piccole molecole altamente reattive che derivano principalmente dalla respirazione aerobica. In condizioni fisiologiche, esiste un equilibrio tra i livelli di ROS, prodotti durante il normale metabolismo cellulare, e la loro degradazione ad opera degli antiossidanti endogeni, che li trasformano in molecole non tossiche. La perturbazione di questo equilibrio produce una condizione chiamata stress ossidativo, che è causa di un'ampia varietà di patologie, tra cui danni cardiovascolari, disordini neurologici o alterazioni cromosomiche. Inoltre lo stress ossidativo rappresenta uno dei maggiori stimoli apoptotici, ed è noto che l'apoptosi dei miociti cardiaci gioca un ruolo significativo nello sviluppo dell'infarto del miocardio e di diverse patologie cardiovascolari quali cardiomiopatie dilatative, ipertensione e aterosclerosi.

La famiglia delle superossido dismutasi (*SOD*) è tra gli antiossidanti enzimatici più diffusi ed importanti: se ne conoscono 3 isoforme, una citoplasmatica (*SOD1*), una mitocondriale (*SOD2*) ed una extracellulare (*EC-SOD* o *SOD3*).

Questo lavoro si pone come obiettivo la valutazione dell'espressione delle *SOD*, attraverso tecniche di immunoistochimica applicata ai tissue microarray ed RT-PCR, in un campione di soggetti colpiti da infarto.

Il fine di tale lavoro è verificare l'esistenza di una correlazione statisticamente significativa tra l'espressione delle superossido dismutasi e la patologia ischemica cardiaca.

Valuteremo, infine, l'espressione di marcatori apoptotici, al fine di verificare una corrispondenza tra le variazioni nell'espressione delle superossido dismutasi ed i fenomeni apoptotici.

Introduzione

Anatomia microscopica e macroscopica del cuore

La grandezza del cuore può variare in base alle dimensioni corporee del soggetto, normalmente il cuore ha un peso di 250-300 gr nella donna e 300-350 gr nell'uomo. Lo spessore delle pareti libere dei ventricoli è rispettivamente di 0,3-0,5 cm per il destro e 1,3-1,5 cm per il sinistro. L'incremento delle dimensioni dell'organo e/o dello spessore delle pareti è tipico delle condizioni patologiche (ipertrofia o dilatazione).

Le cavità del cuore sono quattro, due atri e due ventricoli. Gli atri comunicano con i sottostanti ventricoli mediante le valvole atrioventricolari (tricuspide a destra, bicuspide o mitrale a sinistra). Nell'atrio destro sboccano le vene cave e la grande vena coronaria, nel sinistro le quattro vene polmonari. Gli orifizi che mettono in comunicazione il cuore con le arterie, i vasi che trasportano il sangue lontano dal cuore, sono anch'essi asserviti da valvole per impedire il reflusso: la valvola semilunare polmonare (ventricolo destro - arteria polmonare) e la valvola semilunare aortica (ventricolo sinistro - aorta).

Un setto (con due porzioni, interatriale ed interventricolare) divide completamente la parte destra del cuore dalla sinistra.

Il tessuto connettivale presente nel cuore, costituito da cellule di origine mesenchimale deputate alla sintesi di matrice extracellulare, rappresenta un supporto inerte per la contrazione cellulare e per il sistema vascolare; esso svolge inoltre un importante ruolo

di integrazione e sincronizzazione dei movimenti specifici a cui la massa muscolare va costantemente incontro.

La superficie esterna del cuore appare liscia e lucente, in quanto avvolta da una sottile membrana, il pericardio, costituito da due strati distinti: uno esterno, il pericardio fibroso, e uno interno, il pericardio sieroso.

Il pericardio sieroso, o epicardio, riveste le due tonache più interne del cuore, che quindi nel complesso risulta costituito da tre strati uno interno all'altro: l'epicardio, il miocardio e l'endocardio.

L'epicardio è costituito da uno strato sottile e superficiale di cellule poligonali appiattite (mesotelio) e di un sottostante strato connettivale ricco di fibre elastiche (strato sottomesoteliale). Più in profondità si trova uno strato sottoepicardico di connettivo fibrillare lasso, nello spessore del quale decorrono vasi e nervi; in questo strato, soprattutto in corrispondenza dei solchi del cuore, si accumula tessuto adiposo.

Sotto l'epicardio, si trova il miocardio, costituito da fibrocellule muscolari, che sostengono la funzione di pompaggio del sangue nel corpo umano. È la più spessa tra le tre tonache, raggiungendo uno spessore di 5-15 mm, a seconda delle zone, dato che lo spessore del miocardio è maggiore in corrispondenza dei ventricoli ed è correlato al lavoro muscolare effettuato.

Il miocardio è composto da cellule muscolari specializzate chiamate miociti cardiaci o miocardiociti. Essi sono organizzati, in corrispondenza del ventricolo sinistro, la camera che spinge il sangue nella circolazione sistemica, in strati circolari e spirali. Elementi fondamentali dei miocardiociti sono:

- La membrana cellulare o sarcolemma e tubuli T, implicati nella trasmissione dell'impulso.
- Reticolo sarcoplasmatico, sito di stoccaggio dello ione Ca^{2+} necessario per la contrazione.
- Elementi contrattili.
- Mitocondri.
- Nucleo.

Le cellule muscolari cardiache contengono un numero di mitocondri ben superiore alle cellule del muscolo scheletrico e ciò è legato alla completa dipendenza del muscolo cardiaco da un metabolismo aerobico. Il muscolo cardiaco si contrae in una fase definita sistole e si rilassa in una definita diastole.

L'unità funzionale di base è costituita dal sarcomero: esso è a sua volta costituito da filamenti spessi di miosina e filamenti sottili di actina, sono inoltre presenti proteine regolatrici della contrazione quali la tropomiosina e la troponina. La lunghezza di un sarcomero durante una sistole è data dal grado di sovrapposizione delle proteine sarcomeriche. Il processo di contrazione avviene per scorrimento dei filamenti sottili, posti alle due estremità del sarcomero, lungo i filamenti spessi di miosina, ciò determina una parziale sovrapposizione dei due tipi di filamenti. Durante la diastole il sarcomero si allunga, e si riduce lo spazio di sovrapposizione tra le proteine sarcomeriche: ciò incrementa la forza di contrazione disponibile nella successiva fase sistolica. In condizioni patologiche, come durante l'infarto, la sovrapposizione di

actina e miosina si riduce ulteriormente ed, oltre un certo limite, si determina una riduzione permanente nelle capacità contrattili del sarcomero.

I miociti rappresentano soltanto il 25% delle cellule del cuore, ma la loro dimensione, decisamente superiore a quella dei restanti fenotipi cellulari, fa sì che essi rappresentino anche il 90% della massa cardiaca. Le altre cellule presenti sono principalmente fibroblasti, cellule endoteliali e rare cellule del sistema immunitario (in condizioni fisiologiche). Nella porzione atriale del cuore sono presenti miociti cardiaci che morfologicamente e funzionalmente si differenziano da quelli presenti nei ventricoli, in quanto di dimensioni inferiori e ricchi di granuli cellulari contenenti ANP (atrial natriuretic peptide), un fattore implicato in molti processi fisiologici. La funzionalità dei miociti cardiaci è strettamente correlata alla presenza dei cosiddetti dischi intercalari, strutture che permettono una stretta relazione sia meccanica, per la trasmissione della forza di contrazione, sia ionica, per la trasmissione dell'impulso di contrazione.

Nella generazione dell'impulso e nella sua trasmissione, sono di fondamentale importanza i siti caratterizzati dalla presenza del miocardio specifico. Il nodo seno-atriale o pace-maker, sito nei pressi della vena cava superiore, il nodo atrio-ventricolare, sito nell'atrio destro, nello spessore del setto interatriale, il fascio di Hiss che percorre il setto interatriale ed in parte quello interventricolare, prima di dividersi nella branca destra ed in quella sinistra che si diramano in una rete che terminerà nello spessore dei muscoli papillari dei ventricoli destro e sinistro.

Infine, l'ultima tonaca della parete cardiaca è l'endocardio, il rivestimento interno che protegge la cavità cardiaca. È costituito da endotelio sostenuto da uno strato di tessuto connettivo sottoendoteliale, ed ha la funzione di favorire lo scorrimento del sangue all'interno del cuore evitando, in condizioni normali, la formazione di coaguli.

Vasi coronari ed irrorazione del cuore

Generando energia prevalentemente per ossidazione di substrati, il cuore necessita di un costante afflusso di sangue ossigenato. Ciò avviene grazie alle arterie coronarie, due vasi che prendono origine dall'aorta nei pressi del punto di inserzione di quest'ultima nel ventricolo sinistro.

Le arterie coronarie sono vasi lunghi 5-10 cm e del diametro di 2-4 mm, che decorrono sulla superficie dell'organo in corrispondenza del solco coronario e del solco interventricolare. Esse si diramano in una fitta rete di capillari che penetrano nel tessuto cardiaco.

Le tre maggiori arterie coronarie sono l'arteria coronaria anteriore sinistra discendente e la circonflessa sinistra, entrambe derivano dalla biforcazione della branca sinistra dell'arteria coronaria principale, ed, infine, l'arteria coronaria di destra.

L'afflusso di sangue nelle arterie coronarie si realizza principalmente durante la diastole ventricolare, quando la microcircolazione non sarà compressa dalla contrazione del muscolo cardiaco. La conoscenza dell'area di perfusione dei rami delle coronarie aiuta nell'individuazione dell'area di occlusione vascolare e di infarto miocardico.

Descrizione della patologia ischemica

Per infarto si intende l'ischemia e la necrosi di un distretto del miocardio, cioè il danno che consegue al mancato apporto ematico ad un distretto cardiaco, e quindi in ultima analisi di glucosio ed ossigeno, tramite il circolo sanguigno delle arterie coronarie. La sindrome acuta è legata, perciò, al venir meno della funzione cardiaca di pompa ed alle complicanze che ne derivano, in primo luogo le aritmie ipercinetiche (fibrillazione ventricolare, tachicardia ventricolare ecc.) ed ipocinetiche (arresto sinusale, blocco di branca, emblocchi ecc.).

In Italia le cardiopatie ischemiche (sindromi anginose, infarto, scompenso cardiaco congestizio) interessano il 5% della popolazione, con 2.000.000 di ammalati e 350.000 nuovi casi/anno; la morte per causa vascolare costituisce il 45% di tutte le morti.

L'infarto può essere causato:

1. dall'ostruzione acuta di un'arteria coronaria dovuta a trombosi nell'80% dei casi, quasi sempre in prossimità di una placca ateromasica, ossia di una lesione vasale che inizia dalla deposizione di una pappia lipidica, una proliferazione di tessuto muscolare, che in seguito si organizza ed ostruisce il lume vasale;
2. da un'emorragia subintimale per rottura dei capillari neoformati entro la placca ateromasica stessa;
3. da uno spasmo o ripetuti spasmi.

La necrosi inizia dopo 20-40 minuti dall'occlusione ed il processo, a seconda della gravità, può interessare il miocardio subendocardico, che è sottoposto ad uno stress

pressorio maggiore (infarto non Q), oppure, nei casi più gravi, estendersi in senso transmurale, a tutto lo spessore.

Gli infarti presi in analisi durante questo studio sono stati classificati in base ad un fattore temporale, dal momento d'insorgenza dell'evento, al momento del decesso, oltre che, in una successiva fase di analisi, in base ad opportune caratteristiche istologiche, riconosciute dal patologo che ne firmerà il referto autoptico.

Il fattore tempo, in un evento ischemico, è di notevole importanza: il perdurare delle condizioni di anossia nel tessuto interessato dall'occlusione di un vaso coronario porta a delle modificazioni strutturali e funzionali a carico dei miociti cardiaci. Oltre una certa soglia di tempo, subentra la morte cellulare per necrosi. Si individuano, in base al fattore temporale, tre categorie di infarto:

1. La diagnosi di infarto subacuto si delinea quando tra l'insorgenza dell'evento ischemico e la morte trascorrono oltre 24h-48h
2. L'infarto acuto, entro 24h
3. L'infarto iperacuto, entro le 12h

Le conoscenze sui processi che si realizzano durante un evento ischemico e nelle ore successive, sono in gran parte state acquisite grazie a studi su organismi modello, in cui è relativamente semplice indurre ischemie serie tramite occlusione di una delle arterie coronarie. La gravità dell'ischemia che può realizzarsi nell'uomo può essere varia e legata a vari fattori, ma gli eventi molecolari che l'accompagnano sono simili a quelli studiati negli organismi modello, anche se, essi possono realizzarsi in tempi più o meno lunghi. A seguito dell'occlusione di un vaso coronario principale, l'afflusso di

ossigeno nei tessuti si riduce notevolmente ed in brevissimo tempo. Ciò comporta l'inibizione del metabolismo ossidativo mitocondriale.

Il flusso energetico prodotto dalla catena respiratoria diminuisce, aumenta la quantità di nicotinammide adenina dinucleotide ridotta (NADH). Inizia l'inibizione del ciclo di Krebs (degli acidi tricarbossilici) e l'ossidazione degli acidi grassi. In concomitanza con tutto ciò prende inizio un metabolismo basato sulla glicolisi anaerobica. Nelle ischemie, il principale substrato metabolico è il glicogeno sarcoplasmatico.

Il metabolismo glicolitico risulta, però, assolutamente insufficiente al fabbisogno energetico cellulare: a fronte di 38 molecole di ATP prodotte dal metabolismo aerobico, quello anaerobico ne produce soltanto 3 per ogni molecola di glucosio, proveniente dal glicogeno, e metabolizzata attraverso la via anaerobica.

In tali condizioni, anche un metabolismo spinto al massimo, può produrre soltanto il 7% dell'energia necessaria al corretto funzionamento del miocardio.

Per tale motivo, la contrazione muscolare, è rapidamente soppressa durante l'ischemia.

Il lavoro meccanico svolto dal cuore porta rapidamente all'esaurimento delle molecole di ATP disponibili, ma non solo: anche l'ADP viene degradato in AMP. Rapidamente a livello cellulare si accumulano adenosine, inosine, ipoxantine e xantine. Tali cataboliti vengono rapidamente eliminati nel caso di riperfusione della zona infartuata.

I danni prodotti dall'ischemia sono da attribuirsi anche all'accumulo di cataboliti (lattato e nucleotidi purinici, principalmente). Fenomeni di acidosi, accumulo di prodotti azotati tossici derivanti dalla degradazione di amminoacidi ed adenosine e di

fosfati derivanti dalla scissione dell'ATP ed ADP, sono la norma nei fenomeni ischemici.

Le acidosi sono processi che portano ad una serie di conseguenze molto gravi: esse inibiscono la glicolisi anaerobica, riducendo in tal modo, ancor più il metabolismo attivo della cellula, ma non solo. Esse hanno effetti sull'ultrastruttura di molte macromolecole, causano l'aggregazione della cromatina nucleare e la formazione di una matrice amorfa mitocondriale.

L'accumulo dei fosfati è sicuramente causa di disfunzioni contrattili.

Inoltre l'accumulo di cataboliti determina un'alterazione dell'equilibrio osmotico con acquisizione d'acqua dall'ambiente circostante e la susseguente rottura del sarcolemma o danneggiamento del citoscheletro.

L'idrolisi dei trigliceridi di scorta, a livello miocardico, aumenta in caso di infarto e ciò comporta un accumulo di acidi grassi, acetil coenzima A ed acil carnitine a livello cellulare. L'accumulo di esteri degli acidi grassi determina mal funzionamento di molti enzimi fondamentali. Ad esempio l'adenin nucleotide transferasi viene inibita dall'accumulo di Acetil coA. Ciò impedisce la traslocazione dell'ATP dai mitocondri al citoplasma. Inoltre gli acidi grassi possono agire da veri detergenti distruggendo la membrana cellulare.

Negli ultimi anni si è fatta strada la teoria che durante l'infarto e, successivamente, dopo l'eventuale riperfusione, possa determinarsi un aumento di radicali liberi (ioni superossido O^{2-} o idrossido OH) che possono contribuire al danno dei miociti.

I radicali liberi sono specie altamente reattive dell'ossigeno (ROS) che causano gravi danni molecolari a carico dei lipidi, degli acidi nucleici e delle proteine. Molti pathway sono noti come produttori di radicali liberi in condizioni non fisiologiche e nelle prime fasi di ri-perfusione di tessuti precedentemente ischemici. Per esempio, uno dei processi è l'ossidazione delle xantine o l'ossidazione del NADPH dei neutrofili attivati. Questi due processi sono stati entrambi molto studiati. In particolare l'ossidazione delle xantine, che converte l'ipoxantina in xantina e acido urico con il rilascio di superossido e perossido di idrogeno, è coinvolta nella degradazione dell'ATP. Il pathway che coinvolge i neutrofili è particolarmente importante perché essi hanno un ruolo determinante, insieme ai macrofagi, nella fagocitosi dei miociti danneggiati e permettono la sostituzione del miocardio necrotico con il tessuto cicatriziale. Inoltre essi svolgono un ruolo fondamentale nei processi infiammatori che sono causa di ulteriori danni anche a carico dei miociti non danneggiati dall'ipossia. I neutrofili si accumulano in enorme numero nella zona ischemica e continuano a svolgere il proprio ruolo anche dopo ri-perfusione danneggiando anche miociti integri attraverso il rilascio di enzimi litici, quale l'elastasi, e di ROS come cataboliti. Inoltre il loro numero elevato può causare ostruzione dei micro capillari impedendo la ri-perfusione.

Molti studi sono stati condotti sulla presenza di ROS nei siti ischemici prima e dopo ri-perfusione: la quantità di ROS si è dimostrata molto abbondante e l'attività delle SOD e degli altri enzimi antiossidanti, è l'unica a poter attenuare gli effetti negativi della persistenza di tali prodotti.

Eventi molecolari caratterizzanti l'ischemia cardiaca

Fin dai primi minuti successivi all'occlusione di un vaso coronario si hanno delle alterazioni morfo-funzionali a carico delle strutture cellulari della zona interessata dall'ischemia.

Le cellule iniziano a gonfiarsi a causa dell'alterazione dell'equilibrio osmotico, vi è una perdita graduale del glicogeno cellulare ed alterazioni della cromatina nucleare. Questi primi cambiamenti sono reversibili in caso di riperfusione e, quindi, di nuovo apporto di ossigeno e sostanze nutritive. Col passare del tempo, però, alcune alterazioni diventano irreversibili, in particolare due sono le alterazioni di maggiore entità: la formazione di addensati a livello della matrice mitocondriale e la rottura della membrana cellulare a causa dell'eccessivo ingresso d'acqua, provocato dallo scompenso osmotico.

In una fase successiva appaiono le bande di contrazione, indice di necrosi. Tali bande indicano un grave danneggiamento del sarcolemma dovuto ad un accumulo di ioni calcio nel citoplasma ed alla distruzione della ultrastruttura dei sarcomeri e delle miofibrille, unità funzionali di base dei miociti.

Il danno ai miociti, però, in genere, è preceduto da danni ultrastrutturali a carico dei vasi e dei capillari. Le cellule endoteliali della tonaca intima sono le prime a subire danni, la loro rottura provoca il riversamento del contenuto citoplasmatico nel lume del vaso ed aggrava o è causa di occlusione. In caso di riperfusione i danni a livello dell'endotelio provocano una massiva emorragia con riversamento del sangue nei tessuti circostanti. In altri casi, invece, l'occlusione impedisce la riperfusione.

La rottura delle membrane cellulari dei miociti è molto probabilmente legata ad un'alterazione delle molecole che la costituiscono, quali lipidi e proteine, causata, probabilmente, da alterazioni di tipo chimico, piuttosto che da stress di tipo meccanico; studi condotti in laboratorio in mezzi ipotonici hanno mostrato che i miociti sono in grado di assumere dimensioni 150% maggiori delle dimensioni originali senza particolari problemi, quindi durante l'ischemia deve subentrare qualche ulteriore alterazione che ne determina la fragilità della membrana cellulare e del citoscheletro.

La presenza di ROS nelle cellule di un tessuto ischemico è forse la causa maggiore di alterazioni a carico della membrana cellulare delle stesse. Sappiamo che i ROS agiscono sia sui lipidi che sulle proteine. Sui primi determinano la loro ossidazione ed idrolisi che potrebbe essere causa di rottura della membrana, ma la teoria oggi più accreditata è che i ROS interagiscano negativamente, principalmente, sulle proteine della membrana e del citoscheletro ad essa associata, modificandone la struttura ed inducendone un'irreversibile fragilità.

Danni durante la riperfusione

Esiste un'ipotesi secondo la quale anche miociti danneggiati solo lievemente ed in modo reversibile durante l'ischemia, subiscano danni nella successiva fase di riperfusione, per l'alterazione dell'equilibrio osmotico della cellula, per sovraccarico di ioni calcio ed iperproduzione di ROS.

Studi condotti su animali modello non ischemici e perfusi con soluzioni contenenti radicali liberi, enzimi e substrati tipici dei tessuti ischemici, hanno evidenziato che i danni prodotti sui tessuti cardiaci, sono del tutto simili a quelli riscontrati in tessuti ischemici. Ciononostante non è possibile affermare che, durante la riperfusione, la presenza dei radicali liberi sia causa di morte cellulare. Questo perché la misurazione dei radicali presenti subito dopo riperfusione potrebbe essere non quantitativa e, soprattutto, il luogo di produzione dei ROS rilevati potrebbe non essere determinabile. Tali ROS potrebbero provenire da altri distretti corporei attraverso la circolazione e persistere soltanto a livello interstiziale oppure essere prodotti in loco ed, effettivamente essere causa di danni cellulari. In condizioni di ischemia grave ed irreversibile, la produzione di ROS potrebbe avvenire nei pressi o totalmente a carico dei miociti che già sono stati irreversibilmente danneggiati. In tali condizioni la presenza o produzione di ROS può soltanto aggravare o accelerare il danno, ma non di certo esserne causa diretta. Per poter studiare correttamente gli effetti della presenza dei radicali in un sito di infarto è necessario disporre di un sistema sperimentale in grado di ridurre la concentrazione dei ROS durante le fasi dell'ischemia. Infatti esiste una controversia in tale materia che non è stata ancora risolta. I primi studi condotti su animali modello attraverso la somministrazione dell'inibitore della xantina ossidasi o delle SOD non hanno mostrato differenze nelle dimensioni dell'infarto a causa dell'alta variabilità nel contenuto di ROS nel circolo sanguigno coronarico. In successivi studi condotti sul cane, sembra che l'utilizzo delle SOD con o senza catalase possa ridurre l'area di infarto, mentre l'inibitore della xantina ossidasi non ha

ottenuto alcun risultato. In altri animali modello, come il maiale, l'uso di tali enzimi non sembra aver portato benefici.

Un'ulteriore branca di studio si è occupata degli effetti negativi della presenza abbondante dei neutrofili nel sito di infarto. Studi condotti con anti-infiammatori o con anticorpi specifici che bloccano l'azione dei neutrofili nei confronti delle cellule endoteliali, mostrano una riduzione dell'area di infarto. Contrariamente, però, ci sono anche ulteriori studi che non hanno evidenziato differenze sostanziali nelle aree di infarto di soggetti trattati e non.

Alla luce di quanto affermato e degli studi condotti non è possibile fare affermazioni precise sull'effetto della presenza di ROS nei siti ischemici. Il contributo preciso dei radicali liberi sul danno e la morte dei miociti cardiaci non è ancora oggi ben chiaro.

(Cardiovascular Pathology; Pathologic Basis of Disease, Elsevier 2005, 7th edition)

ROS, superossido dismutasi e meccanismi di protezione cellulare

Il cuore è un organo a metabolismo aerobio obbligato, che consuma approssimativamente 8-15 ml di O₂/min/100g tessuto in condizioni di riposo; in condizioni anaerobiche, non può produrre abbastanza energia per sostenere i processi cellulari essenziali. E' dunque indispensabile un apporto costante di ossigeno per la vitalità e le funzioni cardiache (1). Il ruolo dell'Ossigeno è vitale e deleterio al tempo stesso (2, 1): esso partecipa, infatti, alla formazione di NO, fondamentale nel determinare il tono vascolare, la contrattilità cardiaca e molti altri parametri, ed alla formazione di molecole molto importanti conosciute come specie reattive

dell'ossigeno, i cosiddetti ROS che, se da un lato partecipano ai normali processi di signaling cellulare, dall'altro possono indurre danni irreversibili o morte.

Le specie reattive dell'ossigeno sono piccole molecole che derivano principalmente dalla respirazione aerobica (1, 2, 3). Includono i radicali liberi, specie con uno o più elettroni spaiati come l'anione superossido, l'idrossido, e i non radicali, capaci di generare radicali liberi, come il perossido di idrogeno (4, 5, 6, 7). Il ROS vascolare a maggior diffusione ed importanza è l'anione superossido O_2^- , che inattiva l'ossido nitrico, il principale fattore di vasodilatazione (9). Elevati livelli di anione superossido, con il conseguente accumulo di perossido di idrogeno e la diminuzione della biodisponibilità di ossido nitrico giocano un ruolo critico nella regolazione del rimodellamento vascolare (4, 5) attraverso la modulazione di processi quali contrazione e dilatazione cellulare, migrazione, crescita ed apoptosi delle cellule, turnover delle proteine della matrice extracellulare. Possono inoltre interagire e attivare chinasi regolate da segnali extracellulari (ERKs), proteinchinasi attivate da mitogeni (MAPKs), fosfatasi, fattori trascrizionali, in grado di indurre l'espressione di geni pro-infiammatori coinvolti nella risposta infiammatoria vascolare associata a ipertensione ed aterosclerosi (1, 10, 11, 12, 13, 14). Inoltre hanno un importante ruolo nella modulazione della reazione infiammatoria operata dai macrofagi (1, 15).

D'altro canto, uno degli effetti negativi principali dei ROS è quello di reagire direttamente con lipidi, proteine e DNA, una volta abbattute le difese antiossidanti delle cellule, causando danni e/o morte cellulare (1, 2, 15, 16, 17), come avviene nel caso della perossidazione dei lipidi che danneggia le membrane degli organelli e delle

cellule (1, 18, 19), nel caso di mutagenesi del DNA attraverso l'ossidazione delle purine ed altre alterazioni della cromatina ROS-mediate (1, 20, 21) o ancora nel caso di alterazioni di proteine che portano a denaturazione o inattivazione di enzimi critici (1, 22, 23).

In condizioni fisiologiche esiste un equilibrio, conosciuto come “stato redox” della cellula (4, 5), tra i livelli di ROS prodotti durante il normale metabolismo cellulare e la loro degradazione ad opera degli antiossidanti endogeni, enzimatici e non, che li degradano trasformandoli in molecole non tossiche allo scopo di proteggere i tessuti (24, 1, 4, 25). L'alterazione di questo bilanciamento, attraverso l'incremento o il decremento della produzione di ROS, produce una condizione chiamata stress ossidativo. Quando i livelli di ROS sono elevati, essi tendono a reagire con numerose proteine, nonché con DNA e membrane cellulari, causando un'ampia varietà di condizioni patologiche, tra cui danni cardiovascolari come ischemia, ipertensione e aterosclerosi (5, 26, 3, 27, 28), disordini neurologici (29, 30) o alterazioni cromosomiche (5).

Tra i pathways antiossidanti enzimatici meglio caratterizzati ci sono la superossido dismutasi, che permette la formazione di H_2O_2 dall' O_2^- , le catalasi e la glutazione perossidasi, che coordinano la catalisi dell' H_2O_2 in acqua (1, 31, 32, 33, 34). I meccanismi non enzimatici includono gli antiossidanti quali vitamine E, C, β -carotene e glutazione, che funge da substrato ridotto per l'attività enzimatica della glutazione perossidasi (1, 24).

La famiglia delle superossido dismutasi è tra gli antiossidanti enzimatici più diffusi ed importanti e catalizza la dismutazione di due radicali superossido in perossido di idrogeno e ossigeno (35, 9, 36, 37, 33).

La SOD è una proteina ubiquitaria presente in procarioti ed eucarioti. Si tratta di un metallo enzima e, sulla base del tipo di metallo presente nel gruppo prostetico, si distinguono due famiglie di SOD (36, 38-42). Il primo gruppo comprende la Cu/Zn-SOD (SOD1), localizzata nel citosol e nel nucleo (43) delle cellule eucariotiche; il secondo comprende la Fe/Mn-SOD (SOD2), trovata principalmente in batteri e archeobatteri (44-48) e nei mitocondri delle cellule eucariotiche (49-53).

Nel 1982 fu scoperta da Marklund un'ulteriore famiglia di Cu/Zn-SOD, chiamata superossido dismutasi extracellulare (EC-SOD o SOD3), che è risultata la SOD predominante nei fluidi extracellulari, quali linfa, fluidi sinoviali e plasma (54, 55).

Delle 3 isoforme, la Cu/Zn-SOD è la più abbondante in termini di espressione totale in quasi tutti i tipi cellulari ed è altamente espressa nella parete vascolare, dove è appunto l'isoforma predominante (56, 57). Diversi studi hanno dimostrato che l'attività della Cu/Zn-SOD è circa il 50-80% dell'attività totale delle SOD (58-63), la Mn-SOD circa il 2-12% e l'EC-SOD la restante percentuale (58, 59, 61, 64). L'attività della Cu/Zn-SOD ha lo scopo, al pari di quella dell'EC-SOD, di limitare l'incremento dei ROS, permettendo il rilascio del NO e favorendo la dilatazione dell'endotelio. La riduzione della sua attività ha effetti sulla funzione vascolare sia nelle grandi arterie che nei capillari: la deficienza di tale isoforma causa infatti un incremento di superossido vascolare e di perossinitrito, che causano un incremento del tono miogenico, della

vasocostrizione, della permeabilità vascolare e una dilatazione alterata endotelio-dipendente NO-mediata (62, 65, 66) .

La Mn-SOD è il principale enzima antiossidante della matrice mitocondriale: permette la detossificazione dell' O_2^- , proteggendo dallo stress ossidativo, ed è essenziale per il mantenimento del normale sviluppo e della funzionalità cellulare (67-70).

La frequenza allelica di polimorfismi nel gene dell'MnSOD è stata associata alle cardiomiopatie dilatative idiopatiche (71, 72), e ciò suggerisce che essa giochi un ruolo importante nella suscettibilità e nella progressione delle cardiomiopatie dilatative. Topi mutanti deficienti per Mn-SOD muoiono per immaturità di sviluppo, cardiomiopatie, anomalie metaboliche (73, 74), o in caso di sopravvivenza possono presentare insufficienza cardiaca cronica e significativa degenerazione del muscolo cardiaco (67). Al contrario, un'overespressione di MnSOD nel cuore riduce il superossido mitocondriale proteggendo dal danno cardiaco indotto dal diabete, con una regressione dei danni morfologici e delle alterazioni di tipo contrattile (68).

L'EC-SOD, infine, è altamente espressa nei vasi sanguigni, in particolare nelle pareti delle arterie (37, 75, 76), ed è la forma predominante nell'aorta di babbuino e uomo (76). Più del 90% dell'EC-SOD è localizzata nello spazio extracellulare della tonaca muscolare dei vasi, proteggendo la parete delle arterie dallo stress ossidativo (57, 77, 35, 78); una piccola quantità è localizzata sulla superficie delle cellule endoteliali legata ai proteoglicani eparansolfato ed, infine, una porzione ancora minore può essere localizzata in equilibrio tra superficie cellulare/matrice e plasma. Sebbene sia definita come una SOD extracellulare, alcune evidenze dimostrano una sua espressione anche

intracellulare (79, 80). L'espressione nelle cellule vascolari e nella parete dei vasi può essere alterata in risposta a vari stimoli esercitati da fattori di crescita, citochine, angiotensine, nonché durante ipertensione, aterosclerosi e diabete (57, 59, 61, 64, 77, 37, 82, 83); inoltre si verifica un incremento di espressione nelle regioni in cui il flusso vascolare è alterato (84).

L'importanza fisiologica delle SOD è evidente dalle gravi patologie osservate nei topi modificati geneticamente per la mancanza di tali enzimi. Essi muoiono pochi giorni dopo la nascita, a causa del forte stress ossidativo (85); in assenza di SOD1 sviluppano una gran varietà di patologie, tra cui il carcinoma epatocellulare (86), una grave perdita di massa muscolare (87), un'incidenza precoce della cataratta ed una speranza di vita minore. Quelli che mancano di SOD3 non mostrano invece nessun difetto evidente ed hanno una normale aspettativa di vita (88).

È stato ipotizzato che i ROS possano prender parte a meccanismi quali necrosi ed alterazioni della perfusione che portano all'infarto acuto del miocardio. Come citato, il ruolo dei ROS nelle patologie ischemiche cardiache non è ancora del tutto chiaro, ed anche il ruolo svolto dalle SOD è stato interpretato, nel corso di vari studi, in modo controverso. L'overespressione della SOD, infatti, sembra ridurre le dimensioni dell'infarto nei topi, agendo direttamente sul livello dei ROS (1, 89, 90, 5). E' comunque evidente che il ruolo svolto dalle SOD è marginale, in quanto, pur migliorando la prognosi, esse non hanno un effetto drastico sull'insorgenza della patologia ischemica negli organismi modello.

Numerose evidenze hanno dimostrato che i ROS sono fortemente implicati nel signalling che porta all'ipertrofia cardiaca (91, 64, 92, 93). Molti fattori extracellulari capaci di indurre ipertrofia dei cardiomiociti e molti pathways che determinano ipertrofia possono, infatti, essere attivati direttamente o indirettamente dai ROS (94, 1, 95-99).

Diversi studi hanno dimostrato, inoltre, il contributo dei ROS nei processi di rimodellamento cardiovascolare mediante l'attivazione delle MMP, che partecipano alla riconfigurazione della matrice extracellulare, agiscono come molecole segnale nello sviluppo di ipertrofia compensatoria e contribuiscono alla morte dei cardiomiociti mediante apoptosi (1, 100-102). L'attivazione delle MMP associata ai ROS ha un importante ruolo anche nella rottura delle placche vasali, nello sviluppo di trombosi e di occlusione delle coronarie (1, 103).

L'incremento di produzione di ROS è un importante meccanismo nello sviluppo delle disfunzioni vascolari ed endoteliali, che contribuiscono alla vasocostrizione e all'incremento dei danni al tessuto cardiaco, in casi di insufficienza cardiaca (4, 104).

È ormai noto, infine, che le alterazioni del sistema cardiovascolare collegate all'età sono attribuibili all'accumulo a lungo termine dei ROS (1, 105, 106), sebbene il loro contributo relativo nei processi di invecchiamento resti ancora non chiaro .

La morte delle cellule cardiache può essere associata a vari eventi patologici, tra cui l'infiammazione, il danno ischemico, il rigetto in seguito a trapianto (107). Una percentuale di cardiomiociti va incontro quindi ad apoptosi in caso di patologie come

le cardiomiopatie o l'ischemia (107-110), evento quest'ultimo che può essere indotto sperimentalmente generando superossidi (111).

Lo stress ossidativo è uno dei maggiori stimoli apoptotici in diverse patologie cardiovascolari; è stato infatti dimostrato che gioca un ruolo pilota nella progressione dell'infarto del miocardio, nell'ischemia, nell'ipertensione, nelle cardiomiopatie e nell'aterosclerosi (112-116, 4). La morte dei cardiomiociti indotta da stress ossidativo è associata a cambiamenti degli standard strutturali e biochimici delle cellule caratteristici dell'apoptosi (112, 117). L'incremento della produzione di ROS attiva la famiglia delle proteine Bcl-2, il conseguente pathway mitocondriale di caspasi e quello delle MAPKs, e ciò può portare all'apoptosi e all'alterazione della normale funzionalità cardiaca. L'apoptosi è poi naturalmente alla base di numerosi danni cardiovascolari e gioca un ruolo significativo nello sviluppo dell'infarto cardiaco (112, 118-122).

Materiali e metodi

Selezione dei campioni

Per la realizzazione dei TMA sono stati selezionati 132 campioni provenienti dai cuori di pazienti deceduti e sottoposti ad autopsia. Nella scelta dei campioni si è prestata massima cura nel selezionare soltanto i pazienti che avevano un intervallo di tempo tra la morte e l'autopsia, e quindi il prelievo dei campioni, che non fosse superiore alle 12 ore.

SEX N - P	M	W	Unknow	Total
Normal	4	5	1	10
Pathological	61	44	17	122
				132

Distribuzione del campione in base alla variabile sesso

L'età dei soggetti deceduti va dai 17 ai 99 anni, con una media di 74 anni. La popolazione Svizzera è sicuramente da annoverarsi tra le più longeve, infatti, l'età media della Popolazione Europea nel 1998 era di 37,1 anni (Dati: United Nations Population Division, World Population Prospects: The 1998 Revision). Il campione non può essere assunto, per ovvie ragioni, come rappresentativo dell'intera Popolazione Svizzera, ma è indice di un dato comune nella Confederazione Elvetica.

Dei 132 campioni, 122 sono soggetti deceduti per infarto e 10 sono soggetti deceduti per cause non correlabili a patologie cardiovascolari. I soggetti patologici sono stati suddivisi in tre gruppi distinti in base alla diagnosi riportata sul referto autoptico e che

tiene conto della diagnosi effettuata al momento del ricovero. Sono stati così individuati i soggetti con infarto sub-acuto (nr.26), acuto (nr.37) ed iper-acuto (nr.59). Dal referto autoptico sono, inoltre, state prelevate le informazioni circa data di nascita, morte, età e indice di massa corporea del soggetto, oltre che informazioni relative allo stato dell'intero sistema cardiovascolare (presenza di aterosclerosi, infarti pregressi, bypass, riperfusioni, ecc.).

Analisi dei campioni e fasi preliminari di messa a punto del sistema sperimentale

Alla selezione dei campioni, eseguita in prima analisi in base alle informazioni riportate sul referto autoptico, è seguita una fase di analisi diretta dei tessuti.

Sono stati, quindi, analizzati al microscopio i vetrini corrispondenti ai tessuti selezionati in precedenza e colorati con opportune tecniche istologiche (ematossilina e CAB) (**Fig. 1**).

Il fine ultimo di tale fase è stato quello di selezionare quei tessuti che mostravano chiari segni di ischemia, contraddistinti da bande di contrazione, citoplasma ipereosinofilo, cellule “waves”.

In tale fase, inoltre si è provveduto a marcare sulla sezione le aree in cui effettuare il prelievo di tessuto durante la fase realizzativa del TMA, cercando di prelevare, laddove possibile, tessuti dalla zona ischemica, dalla zona marginale dell'infarto e dalla periferia del tessuto.

Contemporaneamente si è provveduto al reperimento di tessuti che fungessero da controlli positivi durante gli esperimenti di immunoistochimica.

Ciò è stato necessario perché gli anticorpi utilizzati per le SOD non sono stati prodotti e testati per tale tecnica, il che ha reso necessario una prima fase di messa a punto dei protocolli sperimentali (**Fig. 4 – 5 – 6**).

Preparazioni istologiche

Campionamento

Per ottenere buoni preparati, è necessario che il materiale prelevato sia molto fresco. Infatti, dopo il prelievo, la fase successiva di fissazione deve avvenire nel più breve tempo possibile, per evitare le alterazioni autolitiche. Se non è possibile, i preparati devono almeno essere refrigerati in attesa del trattamento con i fissativi.

In secondo luogo, è conveniente che i pezzi da fissare non superino 1 cm di diametro. Pertanto, dopo l'espanto, è necessario operare un sezionamento del tessuto o organo, utilizzando pinzette e forbici (o bisturi) molto affilate, cercando di evitare al massimo deformazioni o compressioni improprie.

La fase di sezionamento preliminare deve avvenire sempre in ambiente umido, per evitare l'essiccamento del campione che potrebbe produrre alterazioni nel tessuto. Quindi, il sezionamento deve avvenire a campione immerso in soluzione fisiologica. Una volta sezionati, i campioni dovranno essere lavati con soluzione fisiologica per eliminare tracce di sangue o altri liquidi organici. (123)

Fissazione

La fissazione può essere considerata l'operazione più importante della tecnica istologica, dipendendo da essa la buona riuscita di un preparato microscopico. Essenzialmente i suoi scopi sono così classificabili:

- 1) immobilizzare i costituenti cellulari e tissutali del campione in uno stato più vicino possibile a quello vitale.
- 2) consentire al preparato di sopportare gli stress fisici e chimici insiti nelle successive fasi di disidratazione, inclusione e sezionamento.
- 3) preservare i campioni dall'attacco di muffe e batteri che potrebbero proliferare, nutrendosi delle strutture non più in grado di proteggersi.
- 4) interrompere completamente i processi autolitici che si sviluppano nei tessuti non più nutriti ed ossigenati.

La scelta di un reattivo di fissazione rispetto ad un altro dipende sia dalle dimensioni del campione che dal grado di preservazione strutturale richiesto dalle caratteristiche di risoluzione del microscopio ottico usato. Il fissativo deve essere scelto in funzione della natura dei costituenti chimici della cellula che si desiderano conservare: ad esempio, le strutture proteiche sono facili da preservare, mentre gli zuccheri semplici sono piuttosto labili. (123)

Inoltre, dal momento che la massima parte dell'architettura cellulare è costituita da proteine, un buon agente di fissazione per l'istologia deve essere principalmente un ottimo stabilizzatore di queste macromolecole.

Tutti i fissativi, utilizzati in singolo o in combinazione, devono necessariamente essere preparati come soluzioni isotoniche e a pH 7.4, per impedire fenomeni di collassamento o di rigonfiamento dei campioni, legati agli stress osmotici.

Per la realizzazione dei campioni istologici presi in esame, si è utilizzata la formaldeide al 4%. Essa rappresenta il fissativo di più ampio impiego nella routine di un laboratorio istopatologico. Possiede ottime qualità per la fissazione istologica

- Ha un elevato grado di penetrazione e non provoca un indurimento eccessivo dei tessuti.
- Non dissolve i lipidi ed è possibile mantenere per varie ore i preparati immersi.
- E' capace di lasciare inalterato lo stato chimico-fisico delle sostanze di natura glicidica

La sua azione si esplica principalmente a carico delle proteine. In particolare in presenza del fissativo i protidi vanno incontro a due processi tra loro distinti, indicati come denaturazione e reticolazione.

-Denaturazione: consiste in un'alterazione delle strutture secondaria e terziaria delle molecole proteiche, le quali perdono la configurazione globulare per assumerne una filamentosa, senza subire modificazioni nel loro contenuto aminoacidico.

-Reticolazione: comporta la formazione di ponti metilenici tra proteine denaturate e contigue. (124)

Allo stato naturale la formaldeide è un gas, ma in istologia viene usata in forma di soluzione acquosa, denominata formalina, normalmente utilizzata a concentrazioni tra 4-10%.

Dopo la fissazione, i preparati devono essere sottoposti ad una fase di lavaggio in acqua corrente, definita nei protocolli come “acqua di fonte”. L’operazione viene eseguita per eliminare l’eccesso di fissativo che, non avendo interagito con i componenti tissutali, potrebbe interferire con i reattivi impiegati nelle fasi successive, in particolare con le sostanze usate per la colorazione dei campioni.

Disidratazione, chiarificazione ed inclusione

Successivamente, prima di essere sezionati, i campioni devono essere infiltrati con opportuni mezzi (paraffina, resine varie) che, solidificando, includano il tessuto nel loro interno, consentendo il sezionamento del campione. Queste sostanze includenti hanno però lo svantaggio di essere idrofobiche e quindi non riuscirebbero ad infiltrare i campioni ancora idratati. Quindi, è necessario procedere ad una disidratazione dei campioni, per sostituire l’acqua con un mezzo che sia miscibile con le sostanze di inclusione.

La disidratazione può essere effettuata con un qualsiasi agente chimico anidro, capace di sostituire l’acqua presente nei tessuti, in grado di non provocare eccessiva coartazione dei campioni e con la proprietà di essere solubile e miscibile con i solventi intermedi che devono essere applicati prima dell’infiltrazione in paraffina. Da un punto di vista pratico, è l’etanolo ad essere maggiormente utilizzato, con l’applicazione di soluzioni a concentrazioni crescenti di questo disidratante; i tempi di permanenza sono variabili a seconda delle dimensioni del campione (comunque da non superare in totale le 2-3 ore):

- etanolo 70%
- etanolo 80%
- etanolo 90%
- etanolo 95%
- etanolo 100% (effettuando 2 cambi)

Dal momento che l'etanolo, ora contenuto nel preparato dopo la disidratazione, non è miscibile con la sostanza che dovrà infiltrarlo, per la fase di inclusione in paraffina occorre sostituire l'etanolo con un solvente intermedio, che sia miscibile sia con l'etanolo che con la paraffina. Questo processo prende il nome di chiarificazione, in quanto la procedura rende molto trasparenti i campioni. Gli agenti di chiarificazione più utilizzati sono lo xilolo e il toluene.

L'inclusione è la procedura che consente di preparare il tessuto in modo da poter essere sezionato ed ottenerne sezioni di spessore adatto al tipo di osservazione (e quindi al tipo di microscopio) cui saranno sottoposte: 4, 5 μm nel caso della microscopia ottica.

La massima parte dei campioni utilizzati nella tecnica istologica viene inclusa, dopo la fissazione, disidratazione e chiarificazione, in un mezzo solido che ne permette il sezionamento. La sostanza utilizzata per la preparazione dei blocchetti di materiale incluso è la paraffina. La paraffina è una miscela di idrocarburi saturi ad elevato peso molecolare, insolubili sia in acqua che in etanolo. (123)

La paraffina è allo stato solido a temperatura ambiente, ma diventa liquida se portata a temperature superiori al suo punto di fusione, tra i 50° C e i 70° C, generalmente 56-

58° C. La paraffina, prima dell'uso, deve essere sciolta a temperatura di fusione, e poi filtrata per eliminare eventuali impurità.

I passaggi di infiltrazione, da effettuare alla temperatura di 56-58 °C, sono i seguenti:

- xilolo /paraffina (50%-50%)
- paraffina pura (con 2-3 cambi)

I tempi minimi di incubazione sono di tre ore; tempi massimi non ce ne sono, poiché il campione, una volta infiltrato dalla paraffina, non si deteriora. Ad infiltrazione completata, i campioni vengono immersi in contenitori sagomati in cui viene fatta colare paraffina liquida, ed il tutto viene lasciato solidificare a temperatura ambiente.

Realizzazione di TMA

Le fasi finora descritte sono comunemente svolte per tutti i campioni istologici. L'allestimento di un Tissue microarray necessita, però, di una serie di procedimenti che, in alcune fasi, non si discostano molto dalla preparazione di normali campioni istologici. Anche in questo caso, infatti, il campione va sezionato in modo da essere attraversato dalla luce posta al di sotto dell'apparato condensatore del microscopio ottico. Attraverso tecniche di immunoistochimica verranno, poi, messe in evidenza le macromolecole di nostro interesse, ma prima di procedere in tal modo, il tissue microarray va realizzato a partire da campioni istologici già inclusi in paraffina o da campioni di tessuto fresco che andranno processati ed inclusi in paraffina.

Per la realizzazione dei tissue microarray è necessario, però, intervenire attraverso un'apposita apparecchiatura al fine di prelevare, dai blocchetti solidificati (blocchi

istopatologici originali), “carote” di tessuto che vengono, successivamente, innestate in un nuovo blocco di paraffina, precedentemente forato. L’operazione viene ripetuta per ogni singolo campione selezionato, con un’apposita apparecchiatura che permette una regolazione micrometrica delle distanze tra le varie carote innestate nel blocco finale di paraffina (**Fig. 2**). E’ possibile in tal modo ottenere un blocco di paraffina contenente anche più di mille campioni di tessuto. I blocchi di tessuto donatore dovrebbero essere istologicamente rappresentativi e spessi come minimo 1 mm o, preferibilmente, 3-4 mm. Anche blocchi d’archivio di 20-40 anni prima possono essere adeguati all’utilizzo se sono stati fissati in formalina al 4 % (125).

Di solito, si effettuano prelievi di 0.6 mm di diametro che dal blocco donatore vengono depositati nel blocco del TMA con uno spazio tra ogni campione di 0.8 mm. Con questa configurazione, il numero massimo di campioni che possono essere posizionati in un’area di 45 x 25 mm è di circa 1000, ma più frequentemente sono posizionati circa 400-800 campioni (**Fig. 2**). Riducendo il diametro a 0.4 mm è possibile costruire un array con 2500 campioni in un singolo blocco TMA. (125)

Passaggio di fondamentale importanza, che precede la costruzione dell’array, è la scelta dell’area di interesse dello studio. Per far questo si conta soprattutto sull’esperienza e la bravura dell’istopatologo responsabile della scelta del tessuto in cui analizzare l’eventuale espressione di molecole. Viene prelevata una sottile sezione e sottoposta a colorazione con Ematossilina ed Eosina (H + E); l’osservazione al microscopio della sezione stessa suggerirà il punto preciso dove effettuare il *patch* (**Fig. 1**). Dato che la morfologia dei tessuti può cambiare tra le sezioni tagliate,

coloriamo con H + E la prima e poi ogni cinquantesima sezione dei blocchi TMA osservando la morfologia dei campioni.

Il blocco TMA è successivamente sezionato in sezioni da 5 µm che vengono poi posizionate grazie ad un sistema di copertura adesiva, che aiuta a trasferire le posizioni precise dei tessuti dal blocco TMA sul vetrino del microscopio. (125)

Questo sistema di posizionamento dei campioni può essere collegato ad un database che contiene dati demografici, clinico-patologici e di sopravvivenza dei pazienti, permettendo un più rapido collegamento dei dati molecolari con le caratteristiche cliniche e alla costruzione di archivi di immagini.

Sezionamento

Il sezionamento del tessuto viene effettuato utilizzando un microtomo. Il tipo più diffuso, utilizzato per la preparazione di sezioni per la microscopia ottica, è il microtomo a rotazione.

Il blocchetto contenente il tessuto va fissato al supporto semplicemente attraverso un supporto di plastica incluso alla base del blocco di paraffina.

Una perfetta affilatura e pulizia della lama sono, ovviamente, requisiti indispensabili per ottenere buone sezioni. (123)

Prima di effettuare il taglio di ogni singola sezione, sul blocco viene posta una pellicola biadesiva. Effettuato il taglio, la sezione rimarrà adesa su uno dei lati della pellicola e l'altro lato della pellicola aderirà al vetrino. I vetrini con le sezioni adese vengono esposti agli UV per fissare definitivamente le sezioni ai vetrini. Ciò è

indispensabile, affinché non subentrino spostamenti dei *patch* nelle successive fasi di lavorazione (**Fig. 2**).

Anticorpi

Per l'immunolocalizzazione delle tre SOD sono stati utilizzati anticorpi commerciali specifici per ogni singola isoforma.

Per la SOD 1 è stato utilizzato un anticorpo policlonale prodotto in pecora dalla ditta Novus Biologicals (Sheep Polyclonal anti-Superoxide Dismutase 1; NB200-600).

Per la SOD 2 è stato utilizzato un anticorpo monoclonale prodotto in topo dalla ditta Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz Biotechnology, Inc.; sc-65437)

Per la SOD 3 è stato utilizzato un anticorpo policlonale prodotto in coniglio della StressGen (Rabbit Anti-Extracellular Superoxide Dismutase (EC SOD) Polyclonal Antibody; SOD-105).

Tutti gli anticorpi non erano stati testati dalla ditta produttrice per l'immunoistochimica per cui hanno richiesto un processo di messa a punto su controlli positivi. Per la SOD1 e la SOD 2 è stato utilizzato come controllo positivo tessuto di prostata umana sana. (**Fig. 4 - 5**).

Per la SOD 3 è stato utilizzato come controllo positivo tessuto di polmone umano sano (**Fig. 6**).

Sono state così individuate le condizioni sperimentali più opportune per la perfetta efficienza dei singoli anticorpi.

Per la Caspase3 attivata è stato utilizzato un anticorpo policlonale purificato prodotto in coniglio dalla ditta R&D (R&D system; AF835). Tale anticorpo è capace di discriminare la subunità p17 della Caspase3 attivata, ma non rileva il precursore dell'enzima, permettendo in tal modo, di marcare le cellule nel pieno dei processi apoptotici.

IHC

Per effettuare il test è buona norma utilizzare vetrini superfrost. Dopo il taglio, lasciare asciugare i vetrini a temperatura ambiente, in ambiente pulito e privo di polveri.

Sparaffinare le sezioni:

- 4X5' Xilolo
- 3X5' EtOH 100%
- 1X5' EtOH 96%
- 1X5' EtOH 70%
- 3X5' PBS

Per lo smascheramento degli epitopi si è utilizzata una tecnica basata sul calore generato da un forno a microonde da laboratorio, sottoponendo i vetrini ad una temperatura di 90°C per 30' o 60' in un tampone di Sodio Citrato pH 6 (per la sola SOD-1, il tempo del trattamento è stato protratto a 60').

I vetrini sono stati quindi lavati due volte in PBS.

Lavorando con un substrato ossidabile, dal quale deriva la colorazione di rivelazione delle proteine (DAB), è buona norma, se non necessario, effettuare il blocco delle

perossidasi endogene, immergendo le sezioni in un bagno di H₂O₂/MetOH 0,3% (1ml H₂O₂ 30% in 100 ml MetOH) per 30'.

Anche in questo caso seguono due sciacqui in PBS

In condizioni sperimentali particolarmente difficili è possibile effettuare il blocco dei siti di aspecificità per l'avidina e la biotina, attraverso un opportuno kit commerciale (Zimed Invitrogen 00-4303).

Segue la saturazione dei siti di aspecificità in siero (derivante dalla stessa specie in cui è prodotto l'anticorpo secondario) per 30' a temperatura ambiente (RT)

Diluire l'anticorpo primario con la soluzione apposita per ridurre eventuale background (Dako Real Antibody Diluent S2022).

Incubare ON a 4°C

Il giorno successivo si effettuano le seguenti fasi:

Capovolgere il vetrini in modo da drenare tutto l'anticorpo primario

Lavare 2X5' in TRIS 0,5M/PBS 1:10

Incubazione dell'anticorpo secondario 30' RT (dipende dall'anticorpo primario)

Lavare 2X5' in TRIS 0,5M/PBS 1:10

Incubare in Sol. ABC Elite Vector 30' RT

Lavare 2X5' in TRIS 0,5M/PBS 1:10

Lavare in TRIS 0,05M (50ml di TRIS 0,5 in 500ml finali di H₂O)

Applicare il cromogeno per 5' RT dopo aver parzialmente asciugato le sezioni

(KIT Dako 1ml di diluente + 1 goccia di DAB)

Sciacquare in H₂O di fonte

Ematossilina 25''

H₂O

H₂O

3 sciacqui in HCl

H₂O corrente per 10'

Montare

Valutazione ed analisi statistica dei TMA

L'analisi dei TMA colorati per i singoli marcatori è stata effettuata al microscopio ottico ed in campo chiaro, dato che il cromogeno utilizzato genera una colorazione bruna DAB.

La valutazione dell'espressione delle proteine in analisi è stata di tipo qualitativo e semiquantitativo.

La valutazione è stata effettuata assegnando uno score di intensità di colorazione: 0 per i patch che non presentavano colorazione, 1 per i patch col colorazione molto tenue, 2 per i patch con colorazione media, 3 per i patch con colorazione molto intensa (**Fig. 4 - 6**). Per la sola SOD2, enzima con localizzazione mitocondriale, l'assegnazione degli score si è limitata ai soli valori 0 ed 1, in quanto in tutti i tessuti in analisi l'intensità della colorazione è risultata molto bassa (**Fig. 5**). L'assegnazione degli score è un metodo comunemente utilizzato negli studi effettuati su TMA e rende possibile la valutazione statistica dei dati in una seconda fase.

L'analisi statistica dei dati è stata effettuata con un programma specifico: TMA Foresight 3. Tale software permette la valutazione dei coefficienti di correlazione statistica, la creazione di curve di sopravvivenza e numerose altre funzioni che sono tipiche dell'analisi statistica dei dati generati attraverso i tissue microarray.

I coefficienti di correlazione e i valori di significatività statistica riscontrati, sono stati verificati anche attraverso l'utilizzo del software di analisi statistica SPSS Base.

Assegnazione degli score per le variabili biometriche e patologiche

L'analisi dei referti autoptici dei singoli pazienti ha permesso l'acquisizione di una serie di informazioni di notevole importanza per una corretta analisi dei dati ottenuti.

Da ogni singolo referto sono stati prelevate variabili biometriche e patologiche, quali:

- Età
- Sesso (non sempre possibile)
- Indice di massa corporea
- Classificazione dell'infarto

Tali dati sono stati utilizzati durante la successiva analisi per verificare eventuali correlazioni statisticamente significative con i livelli di espressione delle proteine in analisi. Per il sesso, l'indice di massa corporea (BMI) e per la classificazione dell'infarto è stato nuovamente utilizzato il sistema di assegnazione degli score.

Sul sito dell'Istituto Superiore della Sanità, ai primi due posti tra i fattori di rischio non modificabili per l'infarto sono riportati l'età ed il sesso.

Nel nostro studio l'età è stata presa in analisi come variabile lineare, mentre al sesso è stato assegnato uno score 1 per il femminile e 2 per il maschile. Ciò perché gli uomini sono statisticamente più a rischio delle donne.

Anche il peso è da considerarsi un fattore di rischio quando si è al di sopra della soglia del normopeso ed il rischio aumenta notevolmente quanto maggiore è il grado di sovrappeso.

L'indice di massa corporea è dato dalla massa (espressa in Kg) diviso il quadrato dell'altezza (espresso in m).

L'Organizzazione Mondiale della Sanità e la medicina nutrizionale convenzionale usa delle tabelle come la seguente per definire termini da "magrezza" fino a "obesità" in diverse sfumature.

BMI (Body Mass Index)

$x > 40$	Sovrappeso di III grado, score 4
$30 < x < 39,9$	Sovrappeso di II grado, score 3
$25 < x < 29,9$	Sovrappeso di I grado, score 2
$18,5 < x < 24,9$	Normopeso, score 1
$x < 18,4$	Sottopeso, score 0

RT-PCR

La RT-PCR è una metodica estremamente sensibile per rilevare l'espressione di mRNA estratti da un numero limitato di cellule o da piccole quantità di tessuto e può

essere quindi usata come metodo quantitativo per confrontare l'espressione di uno o più geni in diversi campioni, tissutali o cellulari.

E' una tecnica complessa che consta di diverse fasi:

- Estrazione e purificazione degli RNA totali
- Analisi quantitativa e qualitativa dell'RNA estratto
- Sintesi di cDNA (Retrotrascrizione)
- PCR
- Analisi dei prodotti di PCR attraverso elettroforesi su gel d'agarosio, e valutazione dei livelli di espressione dei cDNA "target".

Nella RT-PCR quantitativa, durante la fase di PCR, si amplifica sia il cDNA "target" che si vuole quantizzare sia il cDNA, di un gene house-keeping, cioè espresso in tutti i tipi cellulari ed in tutti i tessuti in maniera costante. I cDNA target e standard sono sottoposti ai medesimi cicli di amplificazione. I geni house-keeping usati come standard nella RT-PCR sono generalmente il GAPDH (gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi) e la Beta-actina. I prodotti amplificati possono poi essere visualizzati mediante elettroforesi su gel d'agarosio.

Prelievo e scelta dei campioni

Per l'analisi di espressione dei geni delle SOD si è deciso di effettuare esperimenti di RT-PCR su cDNA sintetizzati da RNA totali estratti da tessuti di miocardio, provenienti da cuori espantati a soggetti con cardiomiopatia terminale. In particolare i tessuti provengono da soggetti affetti da insufficienza cardiaca post ischemica.

I tessuti normali sono porzioni tissutali di cuori destinati a trapianto.

Estrazione e purificazione di RNA totale

L'RNA totale contiene tutte le tre forme di acido ribonucleico caratteristiche di una cellula di mammifero: rRNA (80-85%), tRNA (10-15%) e mRNA (1-5%).

La purificazione dell'RNA è in genere più difficile di quella del DNA soprattutto a causa della possibile degradazione dell'RNA durante il processo di estrazione dovuta all'azione delle ribonucleasi. La resa di un'estrazione di RNA può essere molto bassa in quanto esso, per sua natura chimica, è soggetto alla degradazione da parte delle RNAsi che si trovano in ogni cellula, e che sono particolarmente abbondanti in tutti i tessuti. Per tale motivo è opportuno sempre adottare specifiche precauzioni durante l'estrazione e la purificazione dell'RNA: il materiale "disposable", cioè eppendorf e puntali, deve essere sempre sterile ed è opportuno lavorare sempre con guanti. Inoltre le eventuali soluzioni necessarie per l'estrazione e la purificazione dell'RNA devono essere sterili, in particolare l'acqua in cui si sospende l'RNA deve essere trattata con dietilpicrocarbonato (DEPC) che inattiva le RNAsi e, successivamente, autoclavata, in modo da sterilizzarla e rendere inattivo il DEPC.

Sono stati sviluppati vari metodi di estrazione dell'RNA nel tentativo di migliorare la resa e la qualità dell'RNA estratto. Essi hanno in comune alcuni punti essenziali:

- Neutralizzazione e distruzione delle RNAsi
- Lisi cellulare
- Denaturazione delle proteine

- Purificazione dell'RNA

Il tentativo di neutralizzare le RNAsi interne alla cellula, che si scatenano appena questa viene lisa, è l'elemento cruciale del processo di estrazione. Sostanze diverse sono state usate come inibitori, le più frequenti sono: l'eparina, il polivinil solfato, i sali di vanadio e l'RNAsina. Oltre alla neutralizzazione delle RNAsi, si può provare a denaturare contemporaneamente tutte le altre proteine cellulari usando sostanze deproteinizzanti come il fenolo o il cloroformio, detergenti come il sodio dodecil solfato (SDS) e il sarcosyl, proteasi quale la proteinasi K con o senza SDS, e potenti denaturanti come la guanidina isotiocianato e l'idrocloruro.

Risolto il problema rappresentato dalle RNAsi si passa alla lisi cellulare con sostanze detergenti associate talvolta a lavoro meccanico con pestelli a mano o con omogenizzatori nel caso dei tessuti. Le cellule tenute in coltura sono, infatti, lisate all'istante mentre per i tessuti è richiesto maggiore impegno; l'importante è che l'operazione sia più veloce possibile per evitare l'azione delle prime RNAsi liberate dalla lisi cellulare. Se si vuole estrarre l'RNA cellulare totale senza separare quello citoplasmatico da quello nucleare si possono lisare le cellule con sostanze che dissolvono, allo stesso tempo, sia la membrana plasmatica che la membrana nucleare e denaturano tutte le proteine; se invece si vuole analizzare l'RNA citoplasmatico e quello nucleare separatamente, si usano detergenti quali il Triton o l'NP40 per lisare le cellule.

La denaturazione delle proteine è necessaria per liberare l'acido nucleico dalle proteine stesse. Questa fase può essere svolta usando fenolo, guanidina tiocianato, o sostanze riducenti come il mercaptoetanolo e il ditione (DTT).

L'ultima fase è la purificazione dell'RNA che viene separato dal DNA genomico mediante precipitazioni differenziali o per ultracentrifugazione, o anche mediante una combinazione di entrambe le tecniche. Il metodo di estrazione e purificazione utilizzato in questo lavoro di tesi è rappresentato dal TRIZOL Reagent, una soluzione monofasica di fenolo e guanidina isotiocianato, aggiunta ai tessuti prima della loro omogenizzazione.

Il TRIZOL è una soluzione che ha la duplice funzione di mantenere l'integrità dell'acido ribonucleico e di rompere le cellule; 1 ml di TRIZOL è sufficiente per processare 100-150 mg di tessuto. La guanidina lisa le cellule e denatura le proteine, mentre il fenolo deproteinizza l'RNA. I tessuti devono essere omogeneizzati e, successivamente, centrifugati al fine di prelevare soltanto il surnatante che contiene cellule e lisati. Le componenti tissutali più grandi, precipitate nel pellet, vengono eliminate. Si "pipetta" più volte la miscela formata da 1 ml di TRIZOL e dalle cellule, per frammentare il DNA genomico, e poi si mettono ad incubare i campioni a temperatura ambiente per 5 minuti per avere la completa dissociazione dei complessi nucleoproteici. Si aggiungono quindi 200 µl di cloroformio e si agitano vigorosamente i campioni che vengono poi incubati per 3 minuti a temperatura ambiente (R.T.). Il cloroformio ha il duplice effetto di sequestrare il fenolo e di appesantire la fase organica che si separerà ancora più nettamente.

Dopo centrifugazione a 12.000 g per 15 min a 4°C, si ottiene la separazione della soluzione in due fasi: una fase organica inferiore di colore rosso, contenente fenolo, proteine e DNA, ed una fase acquosa superiore incolore, contenente l'RNA. Le due fasi sono separate da un'interfase semisolida contenente DNA e proteine.

Si preleva quindi delicatamente la fase acquosa facendo attenzione a non prelevare la fase organica e si precipita l'RNA aggiungendo ai campioni 500 µl di isopropanolo ed incubandoli a R.T. per 10 min. Dopo centrifugazione a 12.000 g per 10 min a 4°C, l'RNA che prima era invisibile si deposita sul fondo della parete e forma un sedimento (pellet). L'ultima fase dell'estrazione consiste nel lavare il pellet centrifugandolo a 7500 g per 5 min a 4°C in 1 ml di una soluzione contenente etanolo al 75% (DEPC). Dopo questo lavaggio si elimina il surnatante e si lascia asciugare il pellet costituito da solo RNA (anche piccole tracce di etanolo potrebbero interferire nella susseguente reazione di retrotrascrizione). Il pellet sarà quindi risospeso in 15-20 µl di H₂O autoclavata o trattata con dietilpirocarbonato (DEPC) che inattiva le RNAsi.

Analisi quantitativa e qualitativa dell'RNA estratto

Per valutare la concentrazione e l'assenza di contaminazioni proteiche dei campioni di RNA può essere usata la SPETTROFOTOMETRIA.

L'RNA mostra picchi di assorbimento a 260 nm a causa dei doppi legami coniugati presenti nelle sue basi. A 260 nm un valore di A_{260} di 1,0 è dato da una soluzione di RNA a singolo filamento con concentrazione di 40 µg/ml. Se si misura anche l'assorbanza a 280 nm si può quantificare la contaminazione da proteine. Infatti, gli

acidi nucleici puri danno rapporti A_{260}/A_{280} di 1,8-2,0 ed un valore sotto 1,6 indica una contaminazione da proteine significativa. La contaminazione da DNA genomico di una preparazione di RNA può essere rilevata dal grado di viscosità del campione e può essere confermata mediante elettroforesi su gel di agarosio.

La lettura delle assorbanze a 260 nm e a 280 nm dei campioni di RNA è stata effettuata attraverso il BIOFOTOMETRO della EPPENDORF.

L'analisi qualitativa dell'RNA estratto viene fatta sottoponendo la stessa quantità (in genere 3 µg) dei campioni di RNA estratti ad elettroforesi su gel di agarosio e formaldeide. Prima di preparare il gel, è necessario lavare la cameretta elettroforetica per almeno un'ora con una soluzione 100 mM di NaOH. Si prepara quindi un gel di agarosio all' 1.5% sciogliendo l'agarosio in una soluzione tampone di MOPS 1X. Dopo ebollizione si lascia raffreddare e si aggiunge formaldeide al 37% (sotto cappa), che è un composto denaturante.

Prima di caricare, ai campioni di RNA si aggiungono 3 volumi di LOADING BUFFER, una miscela di composti necessari rispettivamente per rendere visibile l'acido nucleico sul gel (Bromuro di Etidio) e per denaturare i campioni (Formaldeide e Formammide). Quindi i campioni vanno tenuti a 65°C per 10 minuti e poi analizzati su gel d'agarosio e formaldeide usando come tampone di corsa il MOPS 1X.

Ultimata la corsa è possibile osservare il gel al transilluminatore a luce UV e vedere le tre bande fluorescenti corrispondenti a tre marcatori interni: 28S, 18S e 5S; se l'RNA non è degradato e quindi è integro, le bande saranno ben distinguibili e inoltre la banda del 28S avrà un'intensità di fluorescenza maggiore delle altre due bande ed in

particolare presenterà una fluorescenza quasi due volte più intensa della banda corrispondente al 18S. Qualora l'RNA dovesse essere degradato sul gel apparirà uno "SMEAR" ossia una "strisciata" fluorescente lungo tutto il gel sottostante alle bande. A questo punto possiamo sintetizzare dai nostri RNA i cDNA.

Sintesi di cDNA (retrotrascrizione)

Un cDNA è una molecola di DNA a singola o a doppia elica sintetizzata da un RNA messaggero. Essendo una copia dell'mRNA, anche il cDNA manca delle sequenze non codificanti del genoma, gli introni. Queste regioni vengono rimosse in seguito al processo di maturazione, detto SPLICING, a cui sono sottoposti i trascritti primari, negli eucarioti, prima di uscire dal nucleo e passare nel citoplasma per poter essere tradotti. Dopo la rimozione degli introni, si ha la saldatura degli esoni codificanti adiacenti. Il trascritto primario maturo che passa nel citoplasma avrà inoltre un "cap" all'estremità 5', che ha la funzione di proteggere l'RNA dalla degradazione enzimatica, e una coda di "polyA" formata da residui di acido adenilico posti in successione all'estremità 3', in genere 150-200 basi. Possono essere presenti, alle estremità, anche segmenti non codificanti chiamati "regioni non tradotte" 5' e 3' (UTR).

La retrotrascrizione consente quindi di ottenere cDNA dai corrispondenti RNA precedentemente estratti. Questa reazione è una fase cruciale dell'RT-PCR e può avvenire o contemporaneamente alla PCR o in momenti separati; si possono quindi usare due tubini nei quali aggiungiamo separatamente i due enzimi coinvolti nei due

processi (DNA polimerasi-RNA dipendente e DNA polimerasi-DNA dipendente) o un unico tubino con entrambi gli enzimi e in cui le due reazioni procedono simultaneamente. La separazione delle due reazioni consente di generare un pool di cDNA stabili che possono essere indefinitamente analizzati; la scelta di un unico step di reazione con entrambi gli enzimi ha il vantaggio di ridurre il tempo di lavoro ed il rischio di contaminazioni.

Due sono gli enzimi comunemente usati nella reazione di retrotrascrizione : la AMV-RT (Avian Myeloblastosis Virus Reverse Transcriptase) e la MMLV-RT (Moloney Murine Leukaemia Virus Reverse Transcriptase). L'AMV-RT è un enzima più termostabile e conduce la polimerizzazione a temperature anche superiori a 55°C, quindi riduce i problemi associati alla formazione di strutture secondarie dell'RNA; invece la MMLV-RT ha una ridotta attività RNasi H rispetto all'AMV-RT e per questo motivo è preferita per la sintesi di molecole di cDNA più lunghe e addirittura del “full lenght” cDNA.

Altri componenti essenziali nella reazione di retrotrascrizione sono i primers, indispensabili per l'innescio della reazione di polimerizzazione della trascrittasi inversa. Esistono due tipi di primers: gli oligo dT e i random esameri pd(N)₆. La giusta scelta dei primers è fondamentale per ridurre il “background” e massimizzare il numero di copie di molecole di mRNA che possono essere analizzate da piccole quantità di campione. Gli oligo dT sono oligonucleotidi composti da timidine che si appaiano alla coda di poliA presente all'estremità 3' dell'RNA messaggero, mentre i pd(N)₆ sono degli esameri di nucleotidi che si appaiano in maniera casuale (random) in

più punti del trascritto. Talvolta l'uso di oligo dT non è consigliato in quanto presenta lo svantaggio che parte dell'informazione presente all'estremità 5' del messaggero potrebbe essere perduta. Tale inconveniente non dovrebbe sussistere se usiamo esameri di nucleotidi (pd(N)₆) che si appaiano in siti diversi del trascritto.

Dopo l'appaiamento dei primers l'aggiunta dei quattro desossiribonucleotidi trifosfati consente all'enzima di copiare il messaggero in direzione 5'-3' a partire dai primers.

Nel mio lavoro sperimentale ho condotto la reazione di retrotrascrizione separatamente dalla PCR, usando i primers pd(N)₆ e la trascrittasi inversa MMLV.

Prima di iniziare la reazione di retrotrascrizione, gli RNA totali (1-5 µg di RNA per campione in 8 µl di H₂O sterile) sono stati incubati ad una temperatura di 65°C per 10 minuti e subito messi in ghiaccio per impedire la formazione di strutture secondarie attraverso l'appaiamento delle basi di segmenti complementari distanti, presenti sulla stessa molecola di acido ribonucleico, che potrebbero interferire con l'intero processo di retrotrascrizione.

Dopo centrifugazione è stata aggiunta ai campioni la miscela contenente 5 µl di BULK FIRST-STRAND cDNA REACTION con la MMLV-RT, 1 µl di DTT e 1 µl di primers pd(N)₆; i campioni sono stati poi incubati a 37°C per un'ora.

Sono stati così sintetizzati i cDNA a singolo filamento ancora legati all'RNA in un ibrido che sarà poi denaturato durante la fase iniziale di denaturazione della PCR.

Oligonucleotidi e programmi di PCR

Gli oligo progettati e sintetizzati presso il laboratori del CE.IN.GE., per l'amplificazione dei geni delle SOD sono i seguenti:

SOD1	FW 5' – GCTGGTTTGCGTCGTAGTCTC – 3'	RW 5' – TGCTTCCCCACACCTTCACTG – 3'
SOD2	FW 5' – GGTTGGGGTTGGCTTGGTTTC – 3'	RW 5' – CATTCTCCCAGTTGATTACAT – 3'
SOD3	FW 5' – CCTGCGTTCCTGGGCTGGCTG – 3'	RW 5' – CTCCGTGACCTTGGCGTACAT – 3'

Le temperature ottimali di annealing utilizzate durante le reazioni di RT-PCR sono state:

SOD1	56,1°C
SOD2	50,0°C
SOD3	61,2°C

Per tutte le reazioni sono stati effettuati 30 cicli di amplificazione con una denaturazione iniziale di 5 min. a 94°C; denaturazione di 1 min. a 94°C; annealing 0,5 min. alle temperature indicate; extension 1 min. a 72°C; final extension 5 min. a 72°C.

PCR (Polymerase Chain Reaction)

La PCR offre un approccio alternativo alla clonazione dei geni per la produzione di molte copie di una sequenza identica di DNA a partire anche da piccole quantità di campione. Consente inoltre di valutare l'espressione di un determinato gene confrontandolo con un gene standard di riferimento.

E' una reazione esponenziale composta da cicli ripetuti di denaturazione, appaiamento (annealing) dei primers alle sequenze "target" ed estensione. Questi cicli possono essere reiterati in una macchina programmata, in cui una celletta termostata viene automaticamente e ritmicamente riscaldata per denaturare il DNA e raffreddata per permettere l'appaiamento dei primers alla sequenza che si vuole amplificare. Ad ogni ciclo di reazione si raddoppia la quantità di acido nucleico di partenza, quindi la concentrazione del prodotto finale sarà uguale a 2^n , in cui "n" è il numero di cicli scelti per la reazione.

La PCR è divisa essenzialmente in 3 fasi:

- DENATURAZIONE
- ANNEALING
- ESTENSIONE

Queste tre fasi sono ripetute per un numero di cicli stabilito (20-35). Generalmente ad esse viene aggiunta una fase di denaturazione iniziale ed una fase di estensione finale.

La denaturazione avviene generalmente ad una temperatura di 94°C per 1 o anche 3 minuti e serve a separare i due filamenti di DNA; nel mio caso l'ibrido formato dal cDNA a singolo filamento e dall'RNA usato come stampo per la retrotrascrizione; l'annealing comporta l'appaiamento dei primers alla sequenza "target" che si vuole amplificare (nel nostro caso il cDNA a singolo filamento) e avviene ad una temperatura compresa tra 53 e 61°C per 1 minuto. Questa fase è influenzata molto dalla scelta dei primers che hanno generalmente una lunghezza compresa tra 20 e 25 nucleotidi ed una percentuale di G e C tra il 50 e il 60% . La sequenza nucleotidica

della coppia di primers non deve avere più di quattro basi uguali successive, specialmente se G o C, e deve avere un contenuto di G + C molto simile affinché le temperature di appaiamento siano simili. Inoltre deve esserci un grado minimo di complementarità interna e nessuna complementarità tra i due primers per evitare sia la formazione di strutture secondarie e di “hairpin loop”, sia la formazione di dimeri di primer. Le temperature di appaiamento si basano sulla T_m (temperatura di melting) che è la temperatura a cui il 50% dei primers sono appaiati alla sequenza bersaglio; per primer di più di venti basi la T_m si può calcolare approssimativamente in °C dall'equazione: $T_m = 4 (G + C) + 2 (A + T)$ in cui G, C, A e T sono rispettivamente il numero di purine e di pirimidine del primer.

I primers dovrebbero essere scelti in modo da appaiarsi specificamente solo alla sequenza di nostro interesse per evitare la co-amplificazione di sequenze omologhe, quindi devono essere molto specifici. I due primers scelti per amplificare il cDNA devono appaiarsi a sequenze nucleotidiche di esoni diversi; ciò consente di evidenziare eventuali prodotti amplificati di DNA genomico contaminante che in questo modo risultano essere più lunghi dei prodotti amplificati dei cDNA “target”. Nelle reazioni di PCR di questa tesi sono stati quindi usati coppie di “primers” specifici per il cDNA “target” da amplificare. Per trovare le sequenze nucleotidiche dei cDNA è stata usata la banca dati del sito <http://www.ensembl.org>. Ensembl fa parte di un unico progetto tra EMBL (European Molecular Biology Laboratory), European Bioinformatics Institute (EBI) e il Wellcome Trust Sanger Institute (WTSI) che ha lo scopo di sviluppare un sistema informatico che offre informazioni su genomi eucariotici.

Quindi il progetto Ensembl offre immediatamente, senza alcuna restrizione di accesso, dati esatti dei genomi eucariotici e “software” necessari per l’analisi e la presentazione dei suddetti dati. I “primers” sono stati quindi disegnati con l’ausilio del software OLIGO 6.0, usufruendo della sequenza nucleotidica della EC-SOD presente nella banca dati del sito <http://www.ensembl.org>.

I parametri ottimali nel disegno degli oligo attraverso il software OLIGO 6.0 sono:

- “primers” stabili al 5’ con stabilità decrescente verso il 3’
- bassa stabilità sia di duplex interoligo sia intraoligo
- assenza di formazione di duplex al 3’
- assenza di strutture secondarie fra gli oligo
- %GC paragonabile a %AT.

L’ultima fase della PCR, l’estensione, rappresenta la fase di sintesi della PCR, ed è caratterizzata dall’aggiunta di nucleotidi da parte della DNA polimerasi ai primers che fungono da innesco sulla sequenza “target”. L’enzima DNA polimerasi-DNA dipendente scelto per la reazione di PCR è la Taq polimerasi estratta dal batterio *Thermophilus aquaticus*, che funziona a temperature estremamente elevate (72°C), è termoresistente e non si inattiva a temperature anche più alte (95°C), e mantiene quindi l’attività enzimatica alle alte temperature caratteristiche dei cicli di reazione della PCR.

Oltre alla scelta dei primers un altro parametro da valutare è la concentrazione di Mg^{2+} da usare nella reazione; questo ione è richiesto come cofattore per la Taq polimerasi. Un eccesso stabilizza il DNA a doppio filamento e può impedire la denaturazione

completa del prodotto ad ogni ciclo, portando alla formazione di prodotti indesiderati per appaiamento aspecifico dei primers; però una concentrazione molto bassa di Mg^{2+} potrebbe comunque essere svantaggiosa in quanto può ostacolare la polimerizzazione del filamento da parte della Taq polimerasi.

E' opportuno usare durante la PCR sia un controllo positivo, se possibile, sia un controllo negativo: il primo ci consente di valutare il buon funzionamento della reazione, il secondo ci consente di verificare la sua purezza, assicurandoci che non ci siano contaminazioni. I reagenti usati per una reazione di PCR sono: la Taq polimerasi, i dNTP, il tampone necessario per la reazione di polimerizzazione, il $MgCl_2$, una coppia di primers e l' H_2O sterile.

In genere è preferibile preparare l'intera miscela di reazione contenente tutti i componenti e poi dividerla nei vari campioni da amplificare compresi i due controlli, ovviamente in quello negativo ci sarà l' H_2O sterile e in quello positivo il pool di cDNA contenente sicuramente la sequenza nucleotidica "target".

Analisi dei prodotti di PCR attraverso elettroforesi su gel di agarosio

Il gel può essere preparato a diverse percentuali di agarosio in base alla lunghezza dei frammenti di DNA che si vogliono analizzare: percentuali più alte sono usate per frammenti piccoli mentre percentuali più basse per frammenti di lunghezza maggiore; ad esempio un gel di agarosio al 2% separa molecole di DNA con lunghezza compresa tra 0.1 e 2 kb, mentre gel di agarosio allo 0.3% separano molecole con lunghezza compresa tra di 5 e 60 kb.

I frammenti di DNA, sottoposti durante l'elettroforesi ad un campo elettrico, migrano verso il polo positivo attraverso le maglie del gel formate dall'agarosio, con una velocità inversamente proporzionale al logaritmo del loro peso molecolare e quindi della loro lunghezza. Quindi i frammenti più lunghi restano intrappolati nelle maglie del gel e la loro corsa sarà rallentata, mentre i frammenti più corti migrano con una velocità maggiore.

Ai campioni, prima di caricarli sul gel, viene aggiunto un "LOADING DYE 6X" contenente Glicerolo e Orange G e/o Bromo fenolo blu. La presenza di bromuro di etidio nel gel, trattandosi di una sostanza mutagenica capace di intercalarsi tra le coppie di basi ed emettere fluorescenza se colpita da raggi UV, consente di osservare il gel a corsa ultimata se lo si pone su una lampada ad UV: il transilluminatore. Saranno visibili delle bande diverse corrispondenti ai vari frammenti di DNA.

I gel d'agarosio contenenti le bande fluorescenti, corrispondenti ai frammenti di DNA, possono essere fotografati attraverso diversi sistemi fotografici. Nel mio lavoro sperimentale il sistema utilizzato è la fotocamera POLAROID GEL CAM.

La quantizzazione dell'espressione dei geni delle SOD è avvenuta attraverso un metodo semiquantitativo e densitometrico. I valori sono adimensionali e linearizzati grazie al gene house keeping della GAPDH (**Fig. 7; Grafico 1**).

Risultati

Il primo step di controllo di un tissue microarray è la verifica della bontà dello stesso, intesa come allineamento dei patch secondo la griglia programmata ed integrità dei tessuti prelevati e trasferiti nel blocco di paraffina di destinazione.

A tal fine è stata effettuata una colorazione istologica in ematossilina sui primi vetrini TMA. La conseguente osservazione al microscopio ha evidenziato che i tessuti sono sufficientemente integri e che l'allineamento dei patch è pressoché perfetto (**Fig. 3**).

Tale step è di fondamentale importanza: nel taglio delle sezioni, inevitabilmente, si realizza sempre la perdita di alcuni patch; in alcuni casi ciò è dovuto alla non perfetta adesione della pellicola adesiva posta sul blocco prima del taglio, ma in altri casi, la perdita di alcuni patch può essere causata dall'assenza del tessuto nel sito di innesto dovuta ad un prelievo non preciso o ad assottigliamento del tessuto prelevato a seguito della realizzazione di molte sezioni dal blocco TMA.

Il numero di patch perso durante i tagli effettuati è stato esiguo, quindi i vetrini TMA sono stati utilizzati per le indagini immunoistochimiche così come riportato nei materiali e metodi.

Le colorazioni sui tessuti di controllo effettuate in precedenza e durante gli esperimenti condotti sui TMA hanno evidenziato che l'efficienza e la specificità degli anticorpi è ottima, ma sono state anche motivo di perplessità visti i primi risultati ottenuti sui tessuti cardiaci.

Le colorazioni della SOD-1 e SOD-3 hanno una distribuzione diffusa, anche se nei vari tessuti inseriti nel TMA si evidenziavano differenze di intensità e chiari segni di specificità.

Gli esperimenti sono stati condotti due volte per scongiurare il rischio di una colorazione aspecifica e falsata.

Nessun problema si è riscontrato con gli esperimenti di analisi per la SOD-2 e per la Caspase3 attivata.

Si è dunque deciso di effettuare un'analisi dei vetrini di tipo qualitativo e semiquantitativo in virtù dell'impossibilità di realizzare conte numeriche per le cellule positive, che sicuramente avrebbero restituito un risultato con gran parte dei patch positivi al 100%.

Ho quindi individuati vari gradi di positività ed ho assegnato uno score ad ognuno di essi così come riportato nei materiali e metodi.

I dati sono stati riportati su un foglio Excel sul quale erano già stati riportati tutti i dati biometrici e relativi alla patologia.

Il file è stato analizzato attraverso i software TMA Foresight 3 e SPSS 13.0.

Prima di esaminare i risultati dei test statistici, descriviamo alcune variabili prese in analisi durante questo studio:

Durante i test saranno verificati i valori di correlazione tra le seguenti variabili:

Età, Sesso, l'indice di massa corporea (BMI), classificazione normale e patologica, indicizzata, rispettivamente, con uno score 0 e 1, la diagnosi sul tipo di infarto

(subacuto, acuto ed iperacuto) ed, infine, gli score di intensità di espressione dei singoli marcatori presi in analisi.

Come già affermato nei materiali e metodi, sia l'età che il sesso sono riconosciuti come fattori di rischio non modificabili. Durante tale studio abbiamo voluto verificare se realmente tali fattori potessero essere considerati fattori discriminanti nell'insorgenza della patologia ischemica cardiaca.

L'età mostra effettivamente un fattore di correlazione statisticamente significativo ($p=0,048$; test Spearman's Rho, Kendall's Tau b) con l'insorgenza della patologia **(Tabella 1)**.

Contrariamente, il sesso, nell'ambito del campione preso in analisi, non è risultato un fattore di rischio statisticamente significativo ($p=0,148$; test Spearman's Rho, Kendall's Tau b). Tale dato, è in parte riconducibile al numero limitato dei soggetti normali presi in analisi **(Tabella 2)**.

Anche l'indice di massa corporea non ha correlazione statisticamente significativa (anche se il valore della $p=0,075$, quindi prossimo allo 0,05) con i soggetti normali e patologici, se non in test di correlazione bivariata ad una coda (dati non mostrati) **(Tabella 3)**.

Tutte le proteine in analisi hanno una correlazione inversa con lo stato del soggetto (normale o patologico): ciò indica che esse sono maggiormente espresse nei normali piuttosto che nei patologici. (N-P/SOD1 $p=0,02$; N-P/SOD3 $p=0,001$; N-P/Caspase3 $p=0,01$; test Spearman's Rho, Kendall's Tau b). La SOD2 è l'unica proteina in analisi

che non raggiunge la significatività statistica ($p=0,064$; test Spearman's Rho, Kendall's Tau b) (**Tabella 4**).

Prenderemo ora in analisi ulteriori fattori cercando di spiegarne il significato biologico.

Il tipo di infarto diagnosticato non è riferito all'entità del danno ischemico a carico del tessuto cardiaco, ma soltanto ad un fattore temporale. Ciò è importante nella interpretazione dei dati, soprattutto per comprendere le dinamiche di espressione delle proteine in analisi.

Come descritto nei materiali e metodi, ho assegnato uno score ad ogni tipo di infarto diagnosticato, in base ad un fattore temporale intercorso dalla diagnosi alla morte del soggetto, per cui, basandosi sui livelli di correlazione tra il tipo di infarto e l'intensità di espressione dei singoli marcatori, è possibile comprendere in che modo esse varino durante l'evoluzione della patologia. Nello specifico, è possibile valutare le variazioni nell'espressione delle proteine durante le prime fasi post ischemiche ed i successivi processi di rimozione del tessuto infartuato, ad opera delle cellule del sistema immunitario, e infine quelli di cicatrizzazione e rimodellamento tissutale. Questi ultimi, ovviamente, sono processi cui vanno incontro in maggiore misura i soggetti che, superando la fase critica post infarto, possono rientrare nelle diagnosi di infarti acuti e poi subacuti.

I livelli della SOD1 e della SOD3 hanno una correlazione diretta con il tipo di infarto (Type/SOD1 $p=0,001$, Type/SOD3 $p=0,024$; test Spearman's Rho, Kendall's Tau b), ciò significa che la loro espressione aumenta durante il decorso della patologia,

risultando statisticamente più elevata nei soggetti deceduti con una diagnosi di infarto subacuto, rispetto agli acuti ed iperacuti. Anche in questo caso, non è possibile fare affermazioni certe sui livelli di correlazione tra la SOD2 ed il tipo di infarto ($p=0,22$; test Spearman's Rho, Kendall's Tau b) (**Tabella 5**).

La Caspase3 attivata, qui utilizzata come marcatore delle cellule apoptotiche, ha, invece, una correlazione inversa con il tipo di infarto (Type/Caspase3 $p=0,037$; test Spearman's Rho, Kendall's Tau b) , ma conserva una correlazione diretta con la SOD1 e la SOD3 (SOD1/Caspase3 $p=0,08$, SOD3/Caspase3 $p=0,001$; test Spearman's Rho, Kendall's Tau b): ciò indica che maggiore è l'espressione delle due isoforme della SOD, maggiori saranno anche le cellule che esprimono la Caspase3 e, plausibilmente, le cellule apoptotiche (**Tabella 5**).

Infine andiamo ad osservare le correlazioni che esistono tra i livelli di espressione dei vari marcatori: le tre isoforme dell'enzima antiossidante sono correlate tra loro da un fattore positivo, e tutte sono correlate in modo diretto con la Caspase3. (**Tabella 5**). La SOD 2 ha significatività statistica soltanto nelle correlazioni con la SOD1 e la Caspase3.

L'analisi densitometrica delle immagini dei gel delle RT-PCR ha mostrato che non esistono grosse differenze di espressione dei geni delle tre SOD in tessuti normali e patologici (**Fig. 7; Grafico 1**).

Discussione

Gli esperimenti di microarray consentono di ottenere una grande quantità di informazioni in poco tempo, con un minimo spreco di materiale ed in condizioni sperimentali uniformi. Nell'ambito della ricerca, le analisi condotte attraverso tissue microarray non forniscono una risposta finale ad un problema biologico e sono poco utili ai fini diagnostici, ma consentono di indirizzarci verso nuovi canali di ricerca e di analizzare i problemi da differenti prospettive.

I risultati di tali indagini sono riassumibili in una tabella in cui sono riportati i coefficienti di correlazione statistica con i relativi livelli di significatività.

L'approccio attraverso i Tissue microarray, come detto, ci fornisce l'opportunità di valutare fenomeni biologici da una prospettiva differente: nell'ambito della ricerca biomedica, poter lavorare con un sufficiente numero di campioni è di fondamentale importanza se si vuole approfondire un problema, andando al di là dell'analisi dell'evento singolo. Ciò è vero ancor più quando la ricerca è effettuata su tessuti umani, nei quali, l'incredibile complessità dell'organismo, si rispecchia in un'altissima varietà di espressione dei parametri biometrici.

Il rischio in tali studi, però, è quello di fermarsi alla valutazione dei dati numerici sottovalutando l'interpretazione dei fenomeni biologici che ci sono alla base dei risultati ottenuti.

Per tale motivo, cercheremo ora, di interpretare, dal punto di vista biologico i dati, provando a fare delle ipotesi sugli eventi molecolari che possano essere alla base dei fenomeni in analisi.

L'innovazione proposta da tale studio è l'applicazione dei TMA, tecnica ormai nota ed applicata comunemente negli studi sulle neoplasie, ai tessuti cardiaci postischemici.

I dati ci dicono che, mentre l'età è effettivamente un fattore di rischio, il sesso, nel campione analizzato non lo è. La spiegazione di tale affermazione, che sembra in contraddizione con conoscenze ampiamente dimostrate, può risiedere nell'esiguità del campione in generale, e ancor più, nell'esiguità dei soggetti normali presi in analisi. Tale fattore è da tener presente, soprattutto, quando analizzeremo variabili che si avvicinano molto alla significatività statistica, ma non la raggiungono.

L'indice di massa corporea rientra proprio in tale caso, infatti, esso pur non raggiungendo la significatività statistica per i test a due code (significativo nel test ad una coda, dato non mostrato), si posiziona in prossimità del valore dello 0,05: probabilmente un campione più esteso di soggetti normali avrebbe sancito che, così com'è noto, la forma fisica, e quindi un peso corporeo non al di sopra della norma, sia fondamentale nella prevenzione della malattia cardiaca. Inoltre, negli ultimi anni il numero di persone in sovrappeso, nei Paesi industrializzati, è cresciuto in proporzioni allarmanti e il problema sta assumendo contorni assai seri. Gli Stati Uniti detengono il primato della popolazione globale in sovrappeso (55% con un indice di massa corporea $IMC > 25$) e vittima dell'adiposità (31% con $IMC > 30$). Diversamente dagli Stati Uniti, in Svizzera i fenomeni del sovrappeso e dell'adiposità sono decisamente più contenuti. Stando all'inchiesta sulla salute condotta nel 2002, nel 2001 in Svizzera erano in sovrappeso 1,8 milioni di persone di età superiore ai 15 anni (29,4%). Altre 500'000 persone sono state classificate obese (7,7%), per un totale di 2,2 milioni di

persone in sovraccarico ponderale. Ciò corrisponde a più di un terzo della popolazione di età superiore ai 15 anni (37,1%) (Dati Società Svizzera per la Nutrizione , SSN). Quindi, in una popolazione interessata ancora in modo limitato da fenomeni di obesità, le differenze riscontrabili tra soggetti normali e patologici si affievoliscono sensibilmente, rendendo il dato statisticamente non significativo.

Dal punto di vista prettamente molecolare, lo studio ha fatto emergere alcuni aspetti importanti ed inediti.

La SOD1 e la SOD3 hanno una correlazione inversa con i gruppi normali e patologici, ciò, come già detto precedentemente, significa che vi è una maggiore espressione di tali proteine nei normali, piuttosto che nei patologici.

Ciononostante, per entrambe le proteine il fattore di correlazione con il tipo dell'infarto è positivo. Questa affermazione, a prima vista contraddittoria, in realtà non lo è. La SOD1 e la SOD3 aumentano dopo l'infarto e risultano maggiormente espresse nei soggetti con infarto sub acuto.

Pur essendo un dato descritto per la prima volta nell'uomo, tale andamento dell'espressione è abbastanza prevedibile conoscendo gli eventi che seguono l'infarto al miocardio e descritti ampiamente in precedenza: le alterazione a livello molecolare di gran parte delle molecole biologiche e l'accumulo dei cataboliti a livello cellulare, sono certamente causa di uno stress ossidativo ampiamente superiore alla norma. In tale contesto, le cellule ancora metabolicamente attive, cercano di contrastare tale condizione, aumentando l'espressione degli enzimi antiossidanti. Un'ulteriore spiegazione può risiedere nel maggiore stress ossidativo che si realizza a seguito di

riperfusion: i soggetti che decedono con diagnosi di infarto al miocardio sub acuto possono aver subito interventi farmacologici nel tentativo di ristabilire il circolo sanguigno a livello coronarico (es. terapie trombolitiche). Proprio in tale frangente, alcune fonti bibliografiche citano un ulteriore aumento dello stress ossidativo (Cardiovascular Pathology, W.B. Saunders Company, 1991). Le cellule reversibilmente danneggiate dall'ischemia possono in ultima analisi, prima di soccombere, tentare di opporsi al suddetto stress aumentando l'espressione delle SOD. L'individuazione delle cellule apoptotiche e la discriminazione di esse dalle altre cellule che vanno incontro a necrosi è di fondamentale importanza nel nostro sistema sperimentale. Su sezioni di tessuto, due sono i metodi per rilevare l'apoptosi: un primo metodo immunologico, basato sulla rilevazione della Caspase3 attivata ed un secondo metodo biomolecolare basato sulla rilevazione della frammentazione del DNA, chiamato TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase).

Uno dei motivi per cui si è deciso di utilizzare il primo metodo, piuttosto che il secondo, risiede nella semplicità di esecuzione e nella affidabilità dei risultati. Inoltre, la frammentazione del DNA è un fenomeno ben più tardivo dell'attivazione della Caspase3 nella sequenza di eventi che portano all'apoptosi. Per tale motivo, spesso, la TUNEL non è in grado di rilevare una porzione delle cellule che, pur avendo sorpassato un punto di non ritorno nella sequenza di eventi, tipica della morte cellulare programmata, non presentano ancora una sufficiente frammentazione del DNA per essere rilevata attraverso la TUNEL. Per tali motivi spesso, gli esperimenti di TUNEL ricevono pareri contrastanti dagli addetti ai lavori.

Più controverso è l'aspetto legato all'apoptosi dei miociti cardiaci durante l'ischemia, fenomeno rappresentato, appunto, dall'espressione della Caspase3 clivata o attivata. L'indice di correlazione negativo, indica che i processi apoptotici sono maggiormente presenti nelle prime fasi dopo l'occlusione dei vasi e vanno scemando con il passare del tempo.

Il dato non è contraddittorio con quanto affermato sin'ora, anzi, la correlazione inversa con il fattore temporale è del tutto coerente con i processi di rimodellamento tissutale: infatti negli infarti sub acuti, i processi apoptotici vanno scemando a favore della rimozione dei tessuti necrotici ed alla deposizione della componente fibrotica che darà vita al tessuto cicatriziale.

Inoltre, la Caspase3 correla positivamente e significativamente con tutte e tre le SOD, indice che la maggiore espressione delle SOD, probabilmente indotta da un maggiore stress ossidativo in loco, è correlabile con l'aumento dei processi apoptotici.

L'analisi dei campioni dal punto di vista biomolecolare attraverso RT-PCR non ha mostrato significative differenze tra campioni normali e patologici: il numero dei campioni disponibili era davvero molto esiguo e degli stessi non avevamo informazioni circa il tipo di infarto, ma soltanto che si trattava di tessuti post-ischemici ed appartenevano a pazienti terminali pronti per il trapianto. E' più che plausibile che tali soggetti abbiano subito l'evento ischemico molto tempo addietro e siano sopravvissuti, pur sviluppando una gravissima insufficienza cardiaca. Ovvio che la non uniformità delle condizioni dei soggetti in analisi abbiano contribuito a creare delle differenze che possono sembrare contraddittorie, ma che non lo sono.

Limiti dello studio

Nel corso dello studio sono emersi anche alcuni limiti dell'applicazione di tale tecnica. La valutazione di proteine che rientrano in un normale metabolismo cellulare, può creare problemi di valutazione durante l'analisi del TMA. In tal caso, infatti, diversamente da quanto avviene nello studio di marcatori specifici per una determinata neoplasia, in cui le cellule possono o meno esprimere il marcatore in modo netto, nel caso di enzimi e proteine costitutivamente espresse, è necessario effettuare una valutazione qualitativa e semiquantitativa, piuttosto che una quantitativa. Il fatto però, che anche con un'analisi qualitativa, così come effettuato in tale studio, si possano ottenere ottimi risultati, come si evince dai livelli di significatività statistica molto bassi, è la dimostrazione che la tecnica è ampiamente utilizzabile in vari campi di ricerca e non soltanto nella patologia molecolare.

Prospettive di studio

Il TMA su tessuto cardiaco post ischemico non ha ancora esaurito le informazioni che ci può fornire e, soprattutto, le indicazioni su come procedere in futuro nello studio della patologia ischemica.

Alcuni dati andranno sicuramente approfonditi: l'apoptosi delle cellule cardiache è da sempre un argomento di grande dibattito. Due linee di pensiero si contrappongono: la prima indica i processi apoptotici come effetto dell'ischemia, la seconda come parziale

causa della patologia cardiaca. Quello che oggi possiamo affermare è che i processi apoptotici sembrano contingentati alle prime ore dopo l'occlusione del vaso che porta all'ischemia, andando affievolendosi dopo le 48 ore. Tale dato, se confermato, sarebbe di notevole importanza. L'approccio immunoistochimico ha fornito dei dati importanti, ma in futuro vorrei eseguire esperimenti di TUNEL per confrontare e verificare il dato già in nostro possesso.

D'altra parte, sarebbe interessante capire quali pathway di segnali vengano attivati per l'inizio dell'apoptosi. In tal senso è mia intenzione effettuare esperimenti di immunoistochimica per le proteine FAS e FASL, oltre che per la proteina ARC, il principale mediatore dei fenomeni apoptotici a valle del recettore FAS, capace di attivare la via mitocondriale e/o direttamente la Caspase8 e, quindi, la Caspase3.

Infine vorrei ampliare le conoscenze e lo studio dello stress ossidativo nel tessuto cardiaco infartuato, attraverso tecniche biochimiche (kit per la quantizzazione degli agenti ossidanti, WB).

Dal punto di vista dell'analisi statistica dei dati un aspetto importante è stato tralasciato per motivi di tempo: la selezione di tessuti provenienti dal centro della zona ischemica, dall'immediata periferia e da zone distali, potrebbe permettere un'ulteriore stratificazione dei dati in nostro possesso, rilevando alcuni aspetti inediti. In tal senso è necessario effettuare nuove indagini di carattere statistico sulle diverse porzioni tissutali del TMA. Tale ipotesi non è da sottovalutare e rientrerà sicuramente tra le attività da svolgere in un prossimo futuro.

Iconografia

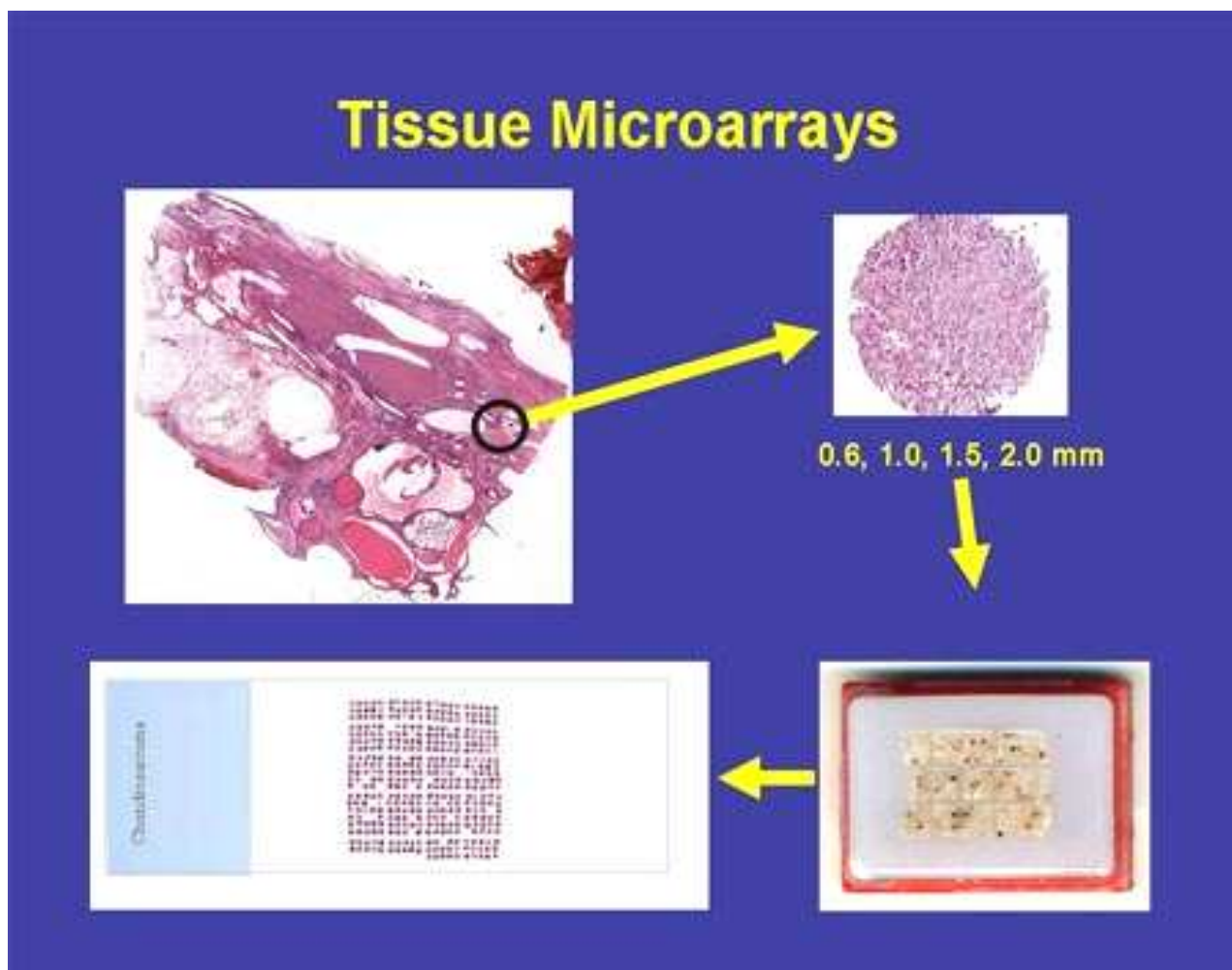


Fig. 1a: Schema concettuale della selezione delle aree di interesse per la costruzione di un TMA. Dalle sezioni di archivio colorate in ematossilina o CAB si selezionano le aree di interesse nelle quali effettuare il prelievo. Nell'immagine l'intera sequenza di produzione del TMA. (Tessuto non cardiaco).

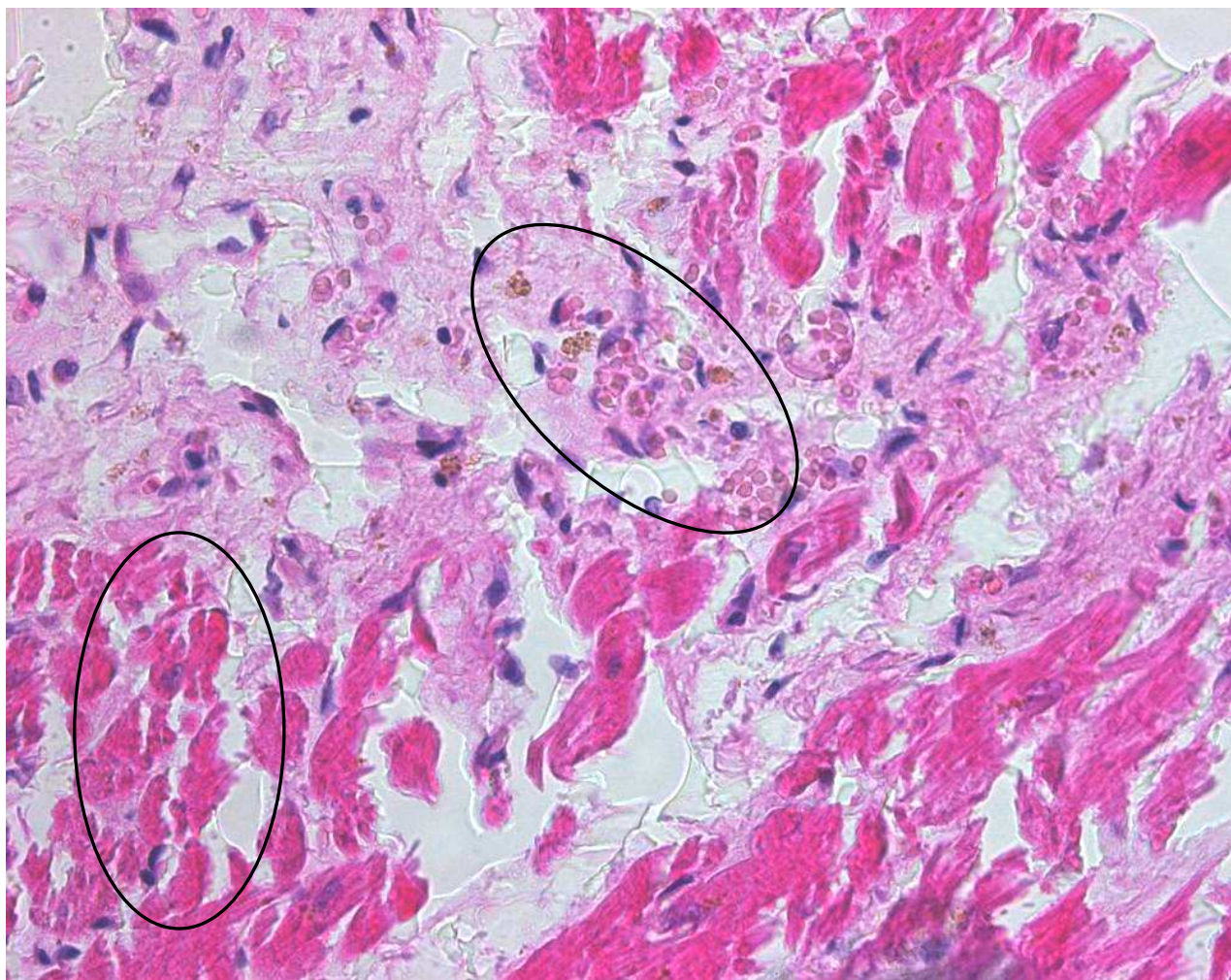


Fig. 1b: Una delle aree di tessuto cardiaco ischemico selezionate per la realizzazione del TMA. Sono bene visibili le bande di contrazione in alcuni miociti cardiaci ormai irreparabilmente danneggiati dall'ischemia ed un'area in cui i miociti danneggiati sono stati rimossi dai macrofagi.

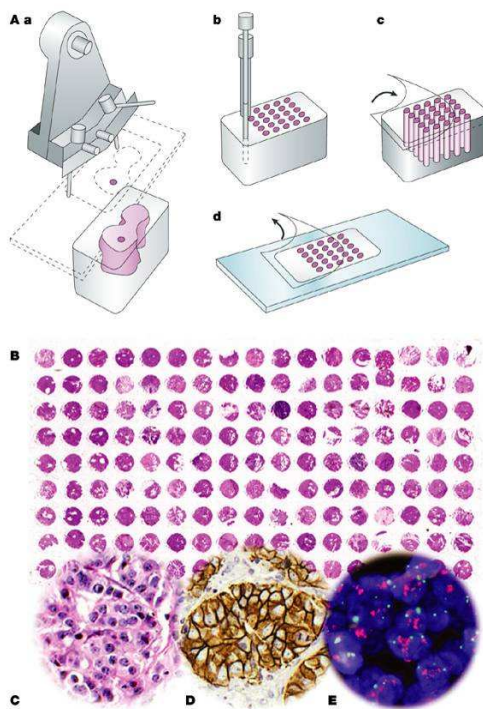


Fig. 2: Fasi realizzative del tissue microarray. Sono visibili la fase di prelievo dal blocco di origine ed il successivo innesto nel blocco di destinazione. In basso le varie fasi che portano alla realizzazione di un TMA ed un esempio delle enormi potenzialità di analisi, tipiche di tale tecnica.

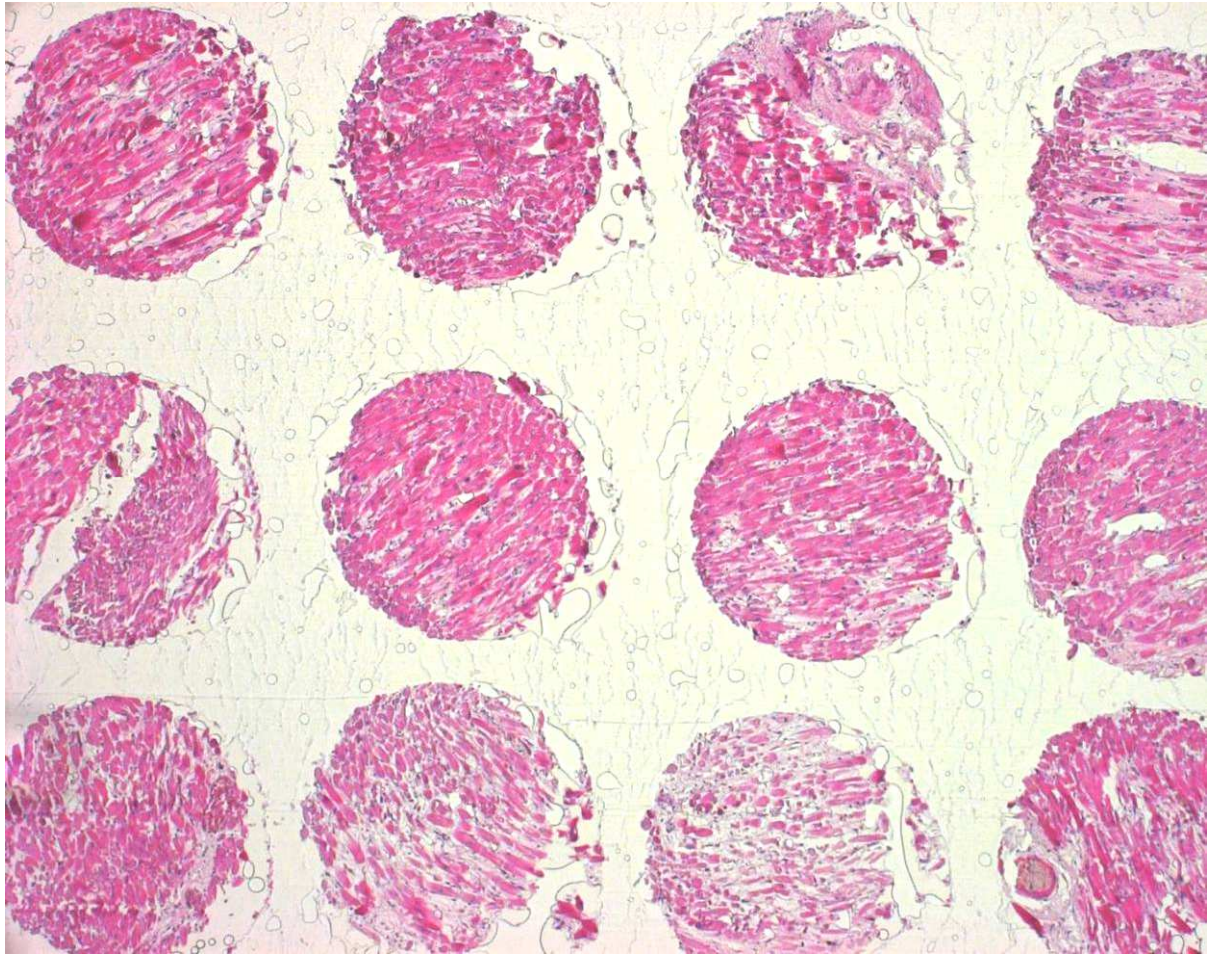


Fig. 3: Fase di verifica della bontà realizzativa del TMA di tessuti cardiaci. L'allineamento e l'integrità dei patch è più che buona.

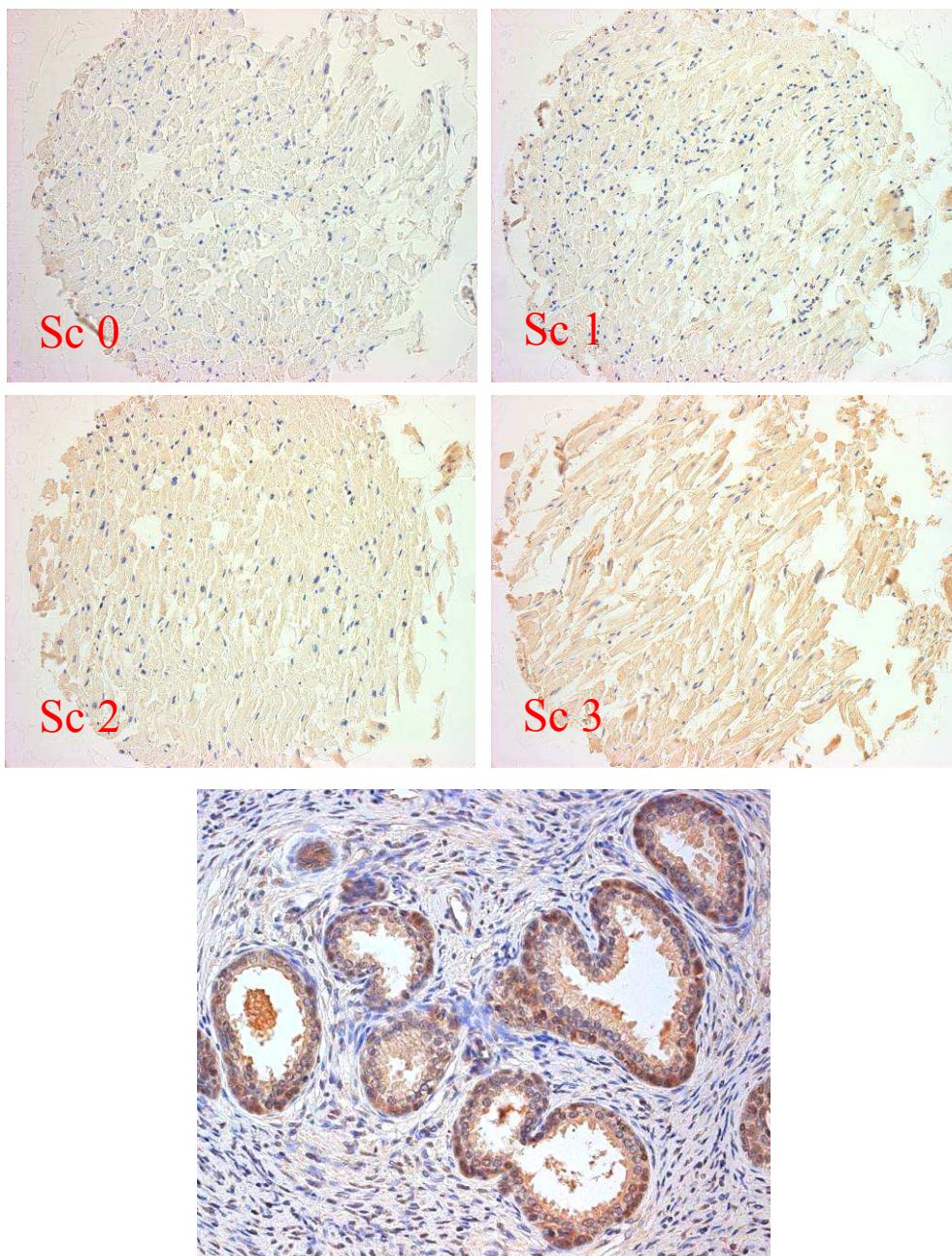


Fig. 4: Assegnazione degli score per l'intensità di colorazione della SOD1 nei tessuti cardiaci. In basso colorazione su tessuto di controllo (prostata normale).

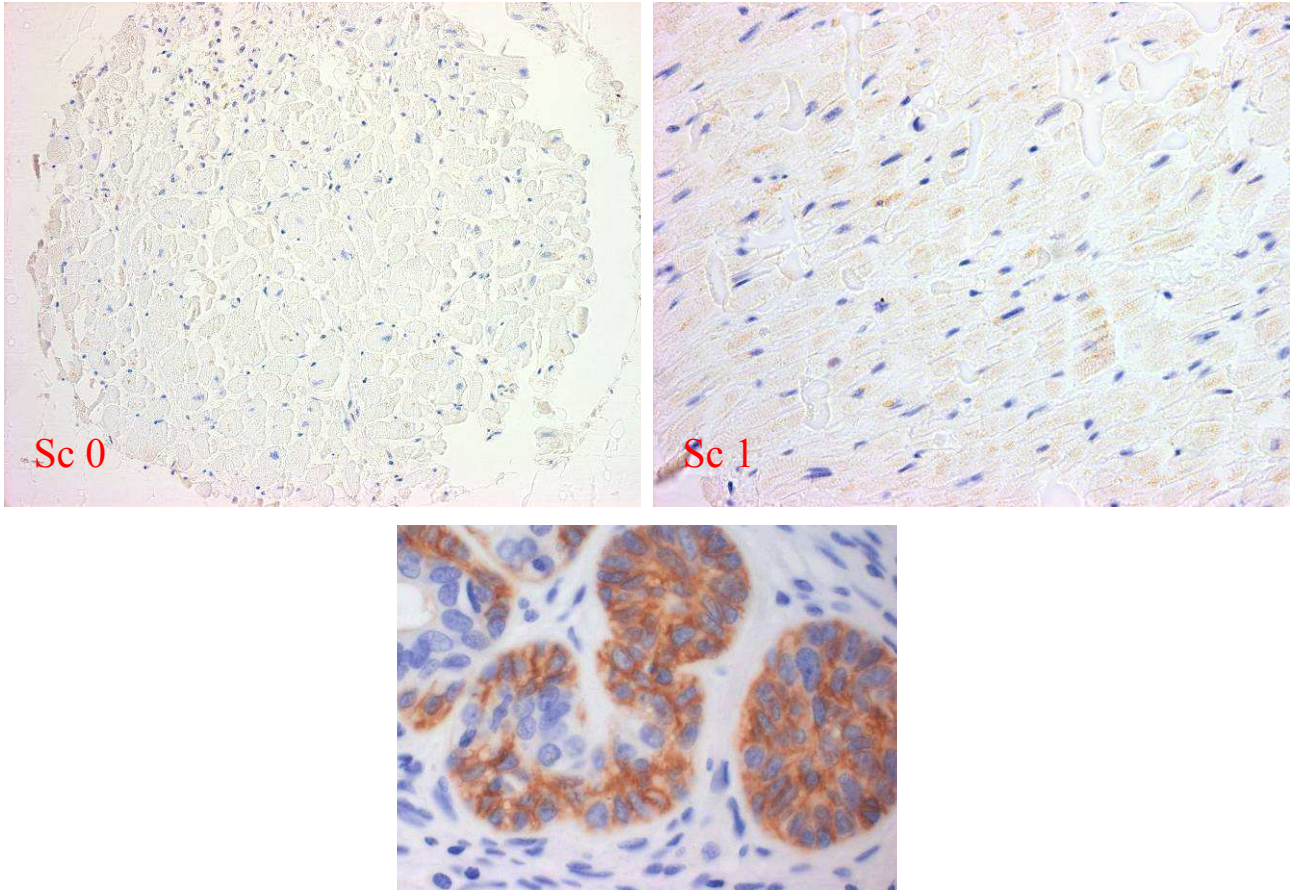


Fig. 5: Assegnazione degli score per l'intensità di colorazione della SOD2 nei tessuti cardiaci. In basso colorazione su tessuto di controllo (prostata normale).

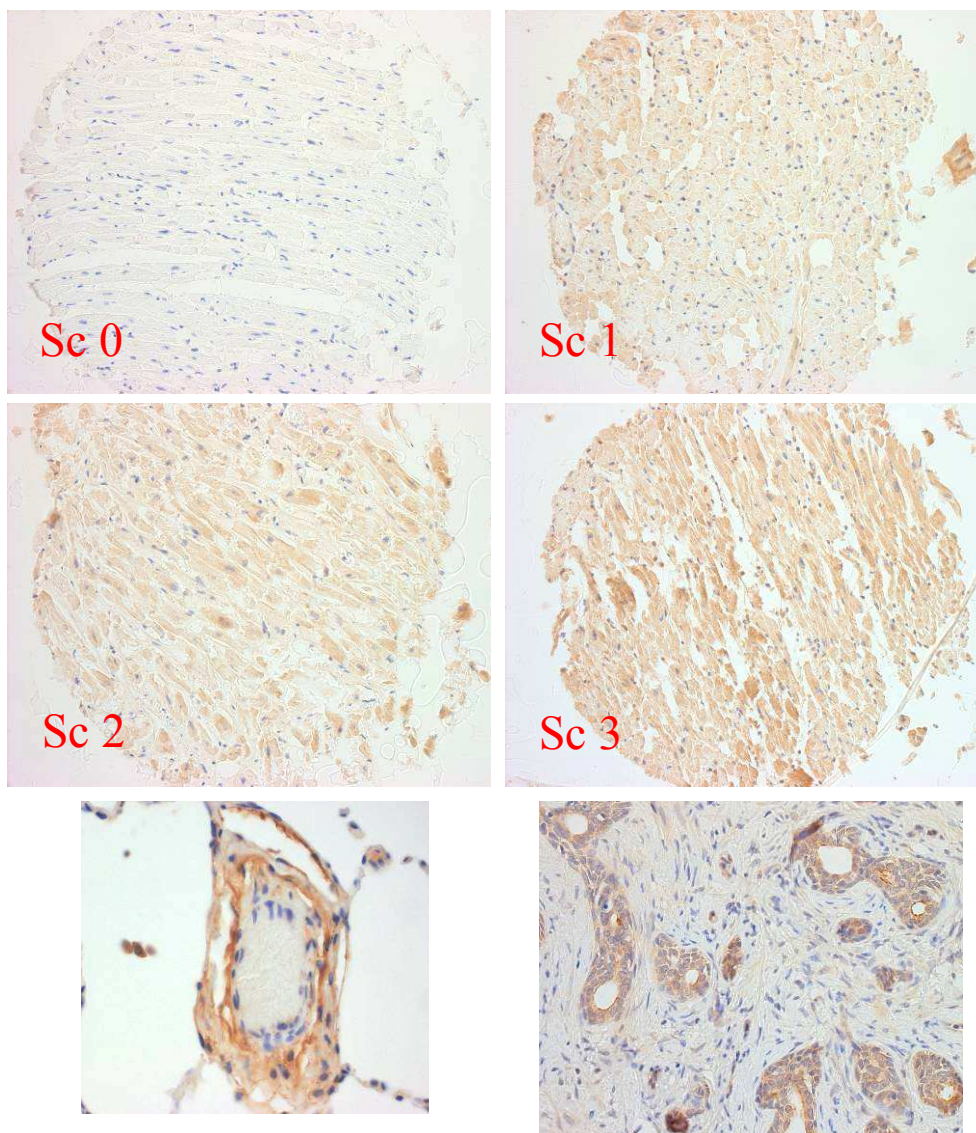


Fig. 6: Assegnazione degli score per l'intensità di colorazione della SOD3 nei tessuti cardiaci. In basso colorazione su tessuto di controllo (prostata normale).

Correlazioni

			Norm./Patol.	Età
Tau_b di Kendall	Norm./Patol.	Coefficiente di correlazione	1,000	-,083*
		Sig. (2-code)	.	,048
		N	396	396
	Età	Coefficiente di correlazione	-,083*	1,000
		Sig. (2-code)	,048	.
		N	396	396
Rho di Spearman	Norm./Patol.	Coefficiente di correlazione	1,000	-,100*
		Sig. (2-code)	.	,048
		N	396	396
	Età	Coefficiente di correlazione	-,100*	1,000
		Sig. (2-code)	,048	.
		N	396	396

*. La correlazione è significativa al livello 0,05 (2-code).

Tabella 1: Calcolo della correlazione tra soggetti normali e patologici ed età

Correlazioni

			Norm./Patol.	Sesso
Tau_b di Kendall	Norm./Patol.	Coefficiente di correlazione	1,000	,078
		Sig. (2-code)	.	,148
		N	396	345
	Sesso	Coefficiente di correlazione	,078	1,000
		Sig. (2-code)	,148	.
		N	345	345
Rho di Spearman	Norm./Patol.	Coefficiente di correlazione	1,000	,078
		Sig. (2-code)	.	,148
		N	396	345
	Sesso	Coefficiente di correlazione	,078	1,000
		Sig. (2-code)	,148	.
		N	345	345

Tabella 2: Calcolo della correlazione tra soggetti normali e patologici ed il sesso

Correlazioni

			Norm./Patol.	Score B.M.I.
Tau_b di Kendall	Norm./Patol.	Coefficiente di correlazione	1,000	,082
		Sig. (2-code)	.	,075
		N	396	396
	Score B.M.I.	Coefficiente di correlazione	,082	1,000
		Sig. (2-code)	,075	.
		N	396	396
Rho di Spearman	Norm./Patol.	Coefficiente di correlazione	1,000	,090
		Sig. (2-code)	.	,075
		N	396	396
	Score B.M.I.	Coefficiente di correlazione	,090	1,000
		Sig. (2-code)	,075	.
		N	396	396

Tabella 3: Calcolo della correlazione tra soggetti normali e patologici e l'indice di massa corporea

Correlazioni

			Norm./Patol.	SOD-1	SOD-2	SOD-3
Tau_b di Kendall	Norm./Patol.	Coefficiente di correlazione	1,000	-,152**	-,102	-,257**
		Sig. (2-code)	.	,002	,064	,000
		N	396	358	331	362
	SOD-1	Coefficiente di correlazione	-,152**	1,000	,109*	,242**
		Sig. (2-code)	,002	.	,039	,000
		N	358	358	321	350
	SOD-2	Coefficiente di correlazione	-,102	,109*	1,000	-,003
		Sig. (2-code)	,064	,039	.	,958
		N	331	321	331	323
	SOD-3	Coefficiente di correlazione	-,257**	,242**	-,003	1,000
		Sig. (2-code)	,000	,000	,958	.
		N	362	350	323	362
Rho di Spearman	Norm./Patol.	Coefficiente di correlazione	1,000	-,161**	-,102	-,269**
		Sig. (2-code)	.	,002	,064	,000
		N	396	358	331	362
	SOD-1	Coefficiente di correlazione	-,161**	1,000	,115*	,269**
		Sig. (2-code)	,002	.	,039	,000
		N	358	358	321	350
	SOD-2	Coefficiente di correlazione	-,102	,115*	1,000	-,003
		Sig. (2-code)	,064	,039	.	,958
		N	331	321	331	323
	SOD-3	Coefficiente di correlazione	-,269**	,269**	-,003	1,000
		Sig. (2-code)	,000	,000	,958	.
		N	362	350	323	362

** . La correlazione è significativa al livello 0,01 (2-code).

* . La correlazione è significativa al livello 0,05 (2-code).

Tabella 4: Calcolo della correlazione tra soggetti normali e patologici ed i livelli di espressione delle superossido dismutasi.

Correlazioni

			Type	SOD-1	SOD-2	SOD-3	Casp-3
Tau_b di Kendall	Type	Coefficiente di correlazione	1,000	,195**	-,067	,112*	-,108*
		Sig. (2-code)	.	,000	,220	,024	,040
		N	366	331	306	333	288
	SOD-1	Coefficiente di correlazione	,195**	1,000	,109*	,242**	,136**
		Sig. (2-code)	,000	.	,039	,000	,008
		N	331	358	321	350	299
	SOD-2	Coefficiente di correlazione	-,067	,109*	1,000	-,003	,223**
		Sig. (2-code)	,220	,039	.	,958	,000
		N	306	321	331	323	292
	SOD-3	Coefficiente di correlazione	,112*	,242**	-,003	1,000	,295**
		Sig. (2-code)	,024	,000	,958	.	,000
		N	333	350	323	362	304
	Casp-3	Coefficiente di correlazione	-,108*	,136**	,223**	,295**	1,000
		Sig. (2-code)	,040	,008	,000	,000	.
		N	288	299	292	304	312
Rho di Spearman	Type	Coefficiente di correlazione	1,000	,212**	-,070	,123*	-,123*
		Sig. (2-code)	.	,000	,221	,024	,037
		N	366	331	306	333	288
	SOD-1	Coefficiente di correlazione	,212**	1,000	,115*	,269**	,152**
		Sig. (2-code)	,000	.	,039	,000	,008
		N	331	358	321	350	299
	SOD-2	Coefficiente di correlazione	-,070	,115*	1,000	-,003	,239**
		Sig. (2-code)	,221	,039	.	,958	,000
		N	306	321	331	323	292
	SOD-3	Coefficiente di correlazione	,123*	,269**	-,003	1,000	,327**
		Sig. (2-code)	,024	,000	,958	.	,000
		N	333	350	323	362	304
	Casp-3	Coefficiente di correlazione	-,123*	,152**	,239**	,327**	1,000
		Sig. (2-code)	,037	,008	,000	,000	.
		N	288	299	292	304	312

** - La correlazione è significativa al livello 0,01 (2-code).

* - La correlazione è significativa al livello 0,05 (2-code).

Tabella 5: Calcolo della correlazione tra tipo di infarto diagnosticato ed i livelli di espressione delle superossido dismutasi e della Caspase3.

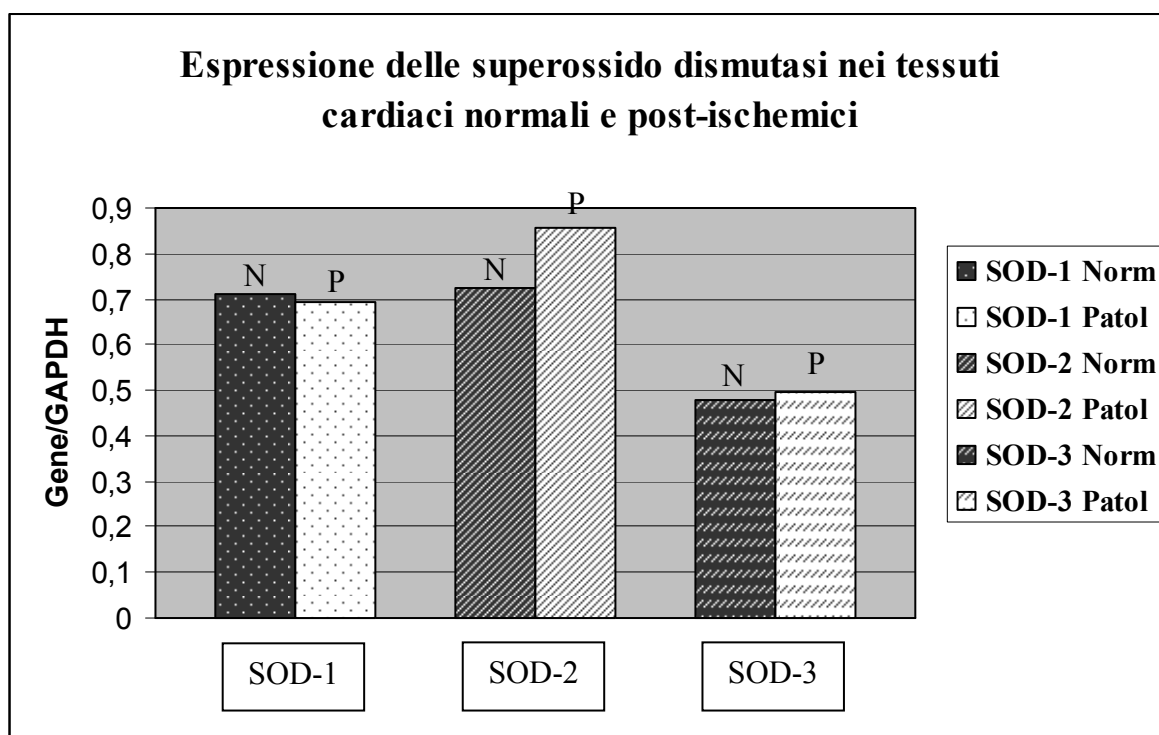
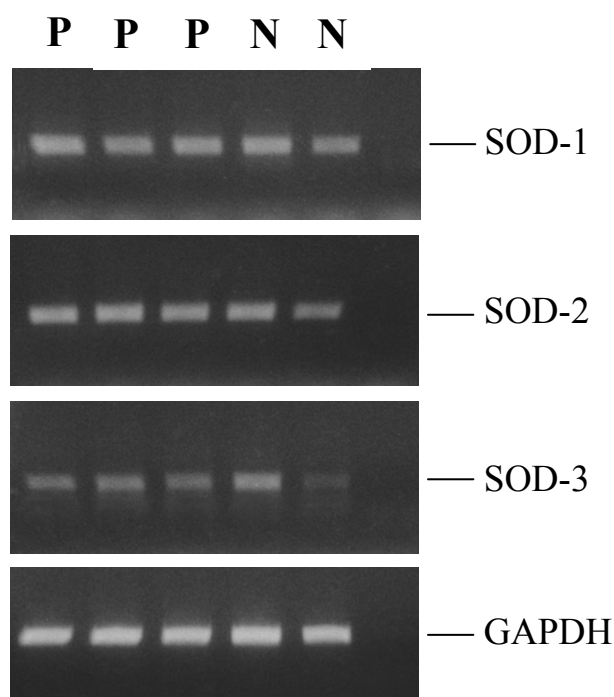


Fig. 7 / Grafico 1: Gel rappresentativi dell'espressione delle superossido dismutasi e della GAPDH in tessuti cardiaci normali e post-ischemici. In basso, istogramma dei risultati della quantizzazione densitometrica (Medie dei valori normali e patologici).

Bibliografia

1. Giordano FJ. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J Clin Invest.* 2005 Mar;115(3):500-8. Review.
2. Davies, K.J. 1995. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem. Soc. Symp.* **61**:1–31.
3. Ide, T., et al. 1999. Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium. *Circ. Res.* **85**:357–363.
4. Seddon M, Yee H Looi and Ajay M Shah Oxidative stress and redox signalling in cardiac hypertrophy and heart failure. *Heart* 2007;93;903-907;
5. Grieve D.J., Byrne J.A., Cave A. C., and Shah A. M. Role of Oxidative Stress in Cardiac Remodelling after Myocardial Infarction. *Heart Lung and Circulation* 2004;13:132–138)
6. Finkel T. Signal transduction by reactive oxygen species in non-phagocytic cells. *J Leukoc Biol* 1999;65:337–40.
8. Suzuki YJ, Ford GD. Redox regulation of signal transduction in cardiac and smooth muscle. *J Mol Cell Cardiol* 1999;31:345–53.
9. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res.* 2000 Nov 10;87(10):840-4.
10. Sawyer, D.B., et al. 2002. Role of oxidative stress in myocardial hypertrophy and failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **34**:379–388.
11. Thannickal, V.J., and Fanburg, B.L. 2000. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **279**:L1005–L1028.
12. Griending, K.K., and FitzGerald, G.A. 2003. Oxidative stress and cardiovascular injury: part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation.* **108**:1912–1916.
13. Machida, Y., et al. 2003. Overexpression of tumor necrosis factor-alpha increases production of hydroxyl radical in murine myocardium. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **284**:H449–H455.
14. Cai H. NAD(P)H oxidase-dependent self-propagation of hydrogen peroxide and vascular disease. *Circ Res.* 2005 Apr 29;96(8):818-22
15. Hensley, K., Robinson, K.A., Gabbita, S.P., Salsman, S., and Floyd, R.A. 2000. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radic. Biol. Med.* **28**:1456–1462.
16. Hemnani, T., and Parihar, M.S. 1998. Reactive oxygen species and oxidative DNA damage. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* **42**:440–452.
17. Suematsu, N., et al. 2003. Oxidative stress mediates tumor necrosis factor-alpha-induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in cardiac myocytes. *Circulation.* **107**:1418–1423.

18. Rathore, N., John, S., Kale, M., and Bhatnagar, D. 1998. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in isoproterenol induced oxidative stress in rat tissues. *Pharmacol. Res.* **38**:297–303.
19. Thollon, C., Iliou, J.P., Cambarrat, C., Robin, F., and Vilaine, J.P. 1995. Nature of the cardiomyocyte injury induced by lipid hydroperoxides. *Cardiovasc. Res.* **30**:648–655.
20. Rahman, I. 2003. Oxidative stress, chromatin remodeling and gene transcription in inflammation and chronic lung diseases. *J. Biochem. Mol. Biol.* **36**:95–109.
21. Konat, G.W. 2003. H₂O₂-induced higher order chromatin degradation: a novel mechanism of oxidative genotoxicity. *J. Biosci.* **28**:57–60.
22. Lockwood, T.D. 2000. Redox control of protein degradation. *Antioxid. Redox Signal.* **2**:851–878.
23. Stadtman, E.R., and Levine, R.L. 2003. Free radical mediated oxidation of free amino acids and aminoacid residues in proteins. *Amino Acids.* **25**:207–218.
24. Nordberg, J., and Arner, E.S. 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic. Biol. Med.* **31**:1287–1312.
25. Li JM, Shah AM. Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. *Am J Physiol* 2004;287:R1014–30.
26. Dhalla AK, Hill MF, Singal PK. Role of oxidative stress in transition of hypertrophy to heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1996;28:506–14.
27. Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005 Jan;25(1):29-38
28. Mueller CF, Laude K, Mc Nally JS and Harrison DG . Redox mechanism in blood vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005, 2, 274-278
29. Bowler RP, Crapo JD. Oxidative stress in airways: is there a role for extracellular superoxide dismutase? *Am J Respir Crit Care Med.* 2002 Dec 15;166(12 Pt 2):S38-43.
30. Fukai T, Folz RJ, Landmesser U, Harrison DG. Extracellular superoxide dismutase and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res.* 2002 Aug 1;55(2):239-49.
31. Kirkman, H.N., and Gaetani, G.F. 1984. Catalase: a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**:4343–4347.
32. Kirkman, H.N., Rolfo, M., Ferraris, A.M., and Gaetani, G.F. 1999. Mechanisms of protection of catalase by NADPH. Kinetics and stoichiometry. *J. Biol. Chem.* **274**:13908–13914.
33. Ursini, F., et al. 1995. Diversity of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol.* **252**:38–53.
34. de Haan, J.B., et al. 2004. Fibroblasts derived from Gpx1 knockout mice display senescent-like features and are susceptible to H₂O₂-mediated cell death. *Free. Radic. Biol. Med.* **36**:53–64.

35. Fukai T, Folz RJ, Landmesser U, Harrison DG. Extracellular superoxide dismutase and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res.* 2002 Aug 1;55(2):239-49.
36. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol.* 1996 Nov;271(5 Pt 1):C1424-37.
37. Fattman CL, Schaefer LM, Oury TD. Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. *Free Radic Biol Med.* 2003 Aug 1;35(3):236-56
38. Marklund SL, Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982), pp. 7634–7638.
39. Marklund SL, Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species. *Biochem. J.* 222 (1984), pp. 649–655.
40. Marklund SL, Extracellular superoxide dismutase in human tissues and human cell lines. *J. Clin. Invest.* 74 (1984), pp. 1398–1403.
41. McCord J.M., Boyle J.A., Day E.D.Jr, Rizzo L.J., Salin M.L., (1977) Superoxide and Superoxide dismutases, Academic Press, London, 129–138.
42. Bannister J.V., Bannister W.H. Rotilio G. (1987) *CRC Crit. Rev. Biochem.* 22, 111–180.
43. Nozik-Grayck E., Suliman H.B., Piantadosi C.A. Extracellular superoxide dismutase. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* (2005). 37 2466–2471
44. Dello Russo A, Rullo R, Nitti G, Masullo M., Bocchini V. *Biochim. Biophys. Acta* 1343, (1997), 23–30.
45. Ursby T., Adinolfi B.S., Al-Karadaghi S., De Vendittis E., Bocchini, V. J. (1999) *Mol. Biol.* 286, 189–205.
46. De Vendittis E., Ursby T., Rullo R., Gogliettino M.A., Masullo M., Bocchini,V. (2001), *Eur. J. Biochem.* 268, 1794–1801.
47. Gogliettino M.A., Tanfani F., Sciré A., Ursby T., Adinolfi B.S., Cacciamani T., De Vendittis E. (2004) *Biochemistry* 43, 2199–2208.
48. Ruocco M.R., Arcari P., Castellano I., Masullo M., Raimo G., De Vendittis E. (2004), in “Biochemistry and Molecular Biology in the Thermophilic Archaeon *Sulfolobus solfataricus*”, (Farina B., Faraone Mennella, M.R., Eds.), Research Signpost, Kerala (India), pp 81–103.
49. Castellano I. , Di Maro A., Ruocco M.R., Chambery A., Parente A., Di Martino M.T., Parlato G., Masullo M., De Vendittis E. (2006) *Biochimie* Accepted for publication.
50. Li Y., Huang T.T., Carlson E.J., Melov S., Ursell P.C., Olson J.L., Noble L.J., Yoshimura M.P., Berger C., Chan P.H., Wallace D.C. Epstein, C.J. (1995) *Nat. Genet.* 11, 376–381.
51. Macmillan-Crow L.A., Cruthirds D.L. (2001) *Free Radic. Res.* 34, 325–336.
52. Hirose K., Longo D.L., Oppenheim J.J., Matsushima K. (1993) *FASEB J.* 7, 361–368.

53. Borgstahl G.E., Parge H.E., Hickey M.J., Beyer W.F.Jr, Hallewell R.A., Tainer, J.A. (1992) Cell 71, 107–118.
54. Fattman CL, Chu CT, Kulich SM, Enghild JJ and Oury TD, Altered expression of extracellular superoxide dismutase in mouse lung after bleomycin treatment. *Free Radic. Biol. Med.* 31 (2001), pp. 1198–1207
55. Schafer yTD, Fattman L M, Choi C.L, Weck A., Watkins K. E, S. C. Depletion of pulmonary EC-SOD after exposure to hyperoxia. *Am. J. Physiol. (Lung Cell Mol. Physiol.)* 283:L777–L784; 2002
56. Didion S.P, Kinzenbaw D.A, Schrader L.I and Faraci F.M. Heterozygous CuZn Superoxide Dismutase Deficiency Produces a Vascular Phenotype With Aging *Hypertension* 2006;48;1072-1079;
57. Faraci FM, Didion SP. Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24: 1367–1373.
58. Stralin P, Kurlsson K, Johansson BO, Marklund SL. The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15:2032–2036.
59. Fukai T, Galis ZS, Meng XP, Parthasarathy S, Harrison DG. Vascular expression of extracellular superoxide dismutase in atherosclerosis. *J Clin Invest.* 1998;101:2101–2111.
60. Fukai T, Siegfried MR, Ushio-Fukai M, Cheng Y, Kojda G, Harrison DG. Regulation of the vascular extracellular superoxide dismutase by nitric oxide and exercise training. *J Clin Invest.* 2000;105:1631–1639.
61. Fukai T, Siegfried MR, Ushio-Fukai M, Griendling KK, Harrison DG. Modulation of extracellular superoxide dismutase expression by angiotensin II and hypertension. *Circ Res.* 1999;85:23–28.
62. Didion SP, Ryan MJ, Didion LA, Fegan PE, Sigmund CD, Faraci FM. Increased superoxide and vascular dysfunction in CuZnSOD-deficient mice. *Circ Res.* 2002;91:938–944.
63. Guo Z, Van Remmen H, Yang H, Chen X, Mele J, Vijg J, Epstein CJ, Ho Y-S, Richardson A. Changes in expression of antioxidant enzymes affect cell-mediated LDL oxidation and oxidized LDL-induced apoptosis in mouse aortic cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:1131–1138.
64. Landmesser U, Merten R, Speikermann S, Buttner K, Drexler H, Hornig B. Vascular extracellular superoxide dismutase activity in patients with coronary artery disease. Relation to endothelium-dependent vasodilation. *Circulation.* 2000;101:2264–2270.
65. Veerareddy S, Cooke CL, Baker PN, Davidge ST. Gender differences in myogenic tone in the superoxide dismutase knockout mouse: an animal model of oxidative stress. *Am J Physiol.* In press.
66. Cooke CL, Davidge ST. Endothelial-dependent vasodilation is reduced in mesenteric arteries from superoxide dismutase knockout mice. *Cardiovasc Res.* 2003;60:635–642.

67. Nojiri H, Shimizu T, Funakoshi M, Yamaguchi O, Zhou H, Kawakami S, Ohta Y, Sami M, Tachibana T, Ishikawa H, Kurosawa H, Kahn R C, Otsu K, and Shirasawa T Oxidative Stress Causes Heart Failure with Impaired Mitochondrial Respiration. *The journal of biological chemistry* 2006 vol. 281, no. 44, pp. 33789–33801, November 3,
68. Shen X, Zheng S, Metreveli N S, and Epstein P N. Protection of Cardiac Mitochondria by Overexpression of MnSOD Reduces Diabetic Cardiomyopathy. *DIABETES*, 2006 VOL. 55, MARCH
69. Chen Z, Siu B, Ho YS, Vincent R, Chua CC, Hamdy RC, Chua BH: Overexpression of MnSOD protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in transgenic mice. *J Mol Cell Cardiol* 30:2281–2289, 1998
70. Yen HC, Oberley TD, Vichitbandha S, Ho YS, St Clair DK: The protective role of manganese superoxide dismutase against adriamycin-induced acute cardiac toxicity in transgenic mice. *J Clin Invest* 98:1253–1260, 1996
71. Hiroi, S., Harada, H., Nishi, H., Satoh, M., Nagai, R., and Kimura, A. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 261, 332–339
72. Valenti, L., Conte, D., Piperno, A., Dongiovanni, P., Fracanzani, A. L., Fraquelli, M., Vergani, A., Gianni, C., Carmagnola, L., and Fargion, S. (2004) *J. Med. Genet.* 41, 946–950
73. Li, Y., Huang, T. T., Carlson, E. J., Melov, S., Ursell, P. C., Olson, J. L., Noble, L. J., Yoshimura, M. P., Berger, C., and Chan, P. H. (1995) *Nat. Genet.* 11, 376–381
74. Lebovitz, R. M., Zhang, H., Vogel, H., Cartwright, J. J., Dionne, L., Lu, N., Huang, S., and Matzuk, M. M. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 9782–9787
75. Ho YS, Magnenat JL, Gargano M, Cao J. The nature of antioxidant defense mechanisms: a lesson from transgenic studies. *Environ Health Perspect.* 1998 Oct;106 Suppl 5:1219-28.
76. Oury. T.D., Chang L.Y., Marklund S.L., Day B.J and Crapo J.D., Immunocytochemical localization of extracellular superoxide dismutase in human lung, *Lab. Invest* **70** (1994), pp. 889–898.
77. Stralin P, Kurlsson K, Johansson BO, Marklund SL. The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15:2032–2036.
78. Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: A comparison of the CnZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biol Med.* 2002;33:337–349.
79. Ookawara T, Eguchi H, Nishimura M, Kizaki T, Takayama E, Saitoh D, Ohno H, Suzuki K. Effects of oxidative stress on the nuclear translocation of extracellular superoxide dismutase. *Biochem Biophys Res Comm.* 2003; 303:914–919.
80. Marklund SL. Extracellular superoxide dismutase. *Methods Enzymol.* 2002; 349:74–80.

81. Stralin P, Marklund SL. Vasoactive factors and growth factors alter vascular smooth muscle cell EC-SOD expression. *Am J Physiol.* 2001;281: H1621–H1629.
82. Nonaka H, Tsujino T, Watari Y, Emoto N, Yokoyama M. Taurine prevents the decrease in expression and secretion of extracellular superoxide dismutase induced by homocysteine: amelioration of homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress by taurine. *Circulation.* 2001;104:1165–1170.
83. Davis ME, Cai H, McCann L, Fukai T, Harrison DG. Role of c-Src in regulation of endothelial nitric oxide synthase expression during exercise training. *Am J Physiol.* 2003;284:H1449–1453.
84. Passerini AG, Polacek DC, Shi C, Francesco NM, Manduchi E, Grant GR, Pritchard WF, Powell S, Chang GY, Stoeckert CJ, Davies PF. Coexisting proinflammatory and antioxidative endothelial transcription profiles in a disturbed flow region of the adult porcine aorta. *Proc Natl Acad Sci.* 2004;101:2482–2487.
85. Li, et al., Y. (1995). Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase.. *Nat. Genet.* 11: 376-381.
86. Elchuri, et al., S. (2005). CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life.. *Oncogene* 24: 367-380.
87. Muller, et al., F. L. (2006). Absence of CuZn superoxide dismutase leads to elevated oxidative stress and acceleration of age-dependent skeletal muscle atrophy.. *Free Radic. Biol. Med* 40: 1993-2004.
88. Sentman, et al., M. L. (2006). Phenotypes of mice lacking extracellular superoxide dismutase and copper- and zinc-containing superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 281: 6904-6909.
89. Chen, E.P., Bittner, H.B., Davis, R.D., Folz, R.J., and Van Trigt, P. 1996. Extracellular superoxide dismutase transgene overexpression preserves postischemic myocardial function in isolated murine hearts. *Circulation.* 94:II412–II417.
90. Schocken DD, Arrieta MI, Leaverton PE, Ross EA. Prevalence and mortality rate of congestive heart failure in the United States. *J Am Coll Cardiol* 1992;20:301–6.
91. T. Adachi, N. Yamazaki, H. Tasaki, T. Toyokawa, K. Yamashita and K. Hirano, Changes in the heparin affinity of extracellular-superoxide dismutase in patients with coronary artery atherosclerosis, *Biol. Pharm. Bull.* 21 (1998), pp. 1090–1093
92. H. Yamada, Y. Yamada, T. Adachi, H. Goto, N. Ogasawara, A. Futenna, M. Kitano, K. Irano and K. Kato, Molecular analysis of extracellular-superoxide dismutase gene associated with high level in serum, *Jpn. J. Hum. Genet.* 40 (1995), pp. 177–184
93. S.L. Marklund, P. Nilsson, K. Israelsson, I. Schampi, M. Peltonen and K. Asplund, Two variants of extracellular-superoxide dismutase: relationship to cardiovascular risk factors in an unselected middle-aged population, *J. Intern. Med.* 242 (1997), pp. 5–14

94. T. Adachi and X.L. Wang, Association of extracellular-superoxide dismutase phenotype with the endothelial constitutive nitric oxide synthase polymorphism, *FEBS Lett.* **433** (1998), pp. 166–168.
95. Xia, Y., Tsai, A.L., Berka, V., and Zweier, J.L. 1998. Superoxide generation from endothelial nitricoxide synthase. A Ca^{2+} /calmodulin-dependent and tetrahydrobiopterin regulatory process. *J. Biol. Chem.* **273**:25804–25808.
96. Xia, Y., Roman, L.J., Masters, B.S., and Zweier, J.L. 1998. Inducible nitric-oxide synthase generates superoxide from the reductase domain. *J. Biol. Chem.* **273**:22635–22639.
97. Griending, K.K., Sorescu, D., and Ushio-Fukai, M. 2000. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ. Res.* **86**:494–501.
98. Sawyer, D.B., et al. 2002. Role of oxidative stress in myocardial hypertrophy and failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **34**:379–388.
99. Thannickal, V.J., and Fanburg, B.L. 2000. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **279**:L1005–L1028.
100. Sabri, A., Hughie, H.H., and Lucchesi, P.A. 2003. Regulation of hypertrophic and apoptotic signaling pathways by reactive oxygen species in cardiac myocytes. *Antioxid. Redox Signal.* **5**:731–740.
101. Mann, D.L., and Spinale, F.G. 1998. Activation of matrix metalloproteinases in the failing human heart: breaking the tie that binds. *Circulation.* **98**:1699–1702.
102. von Harsdorf, R., Li, P.F., and Dietz, R. 1999. Signaling pathways in reactive oxygen species-induced cardiomyocyte apoptosis. *Circulation.* **99**:2934–2941.
103. Rajagopalan, S., Meng, X.P., Ramasamy, S., Harrison, D.G., and Galis, Z.S. 1996. Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability. *J. Clin. Invest.* **98**:2572–2579.
104. Hornig B, Arakawa N, Kohler C, et al. Vitamin C improves endothelial function of conduit arteries in patients with chronic heart failure. *Circulation* 1998;97:363–8.
105. Sinclair, D.A. 2002. Paradigms and pitfalls of yeast longevity research. *Mech. Ageing Dev.* **123**:857–867.
106. Lakatta, E.G. 2003. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: part III: cellular and molecular clues to heart and arterial aging. *Circulation.* **107**:490–497.
107. Liu L, Zhang XJ, Jiang SR, Ding ZN, Ding GX, Huang J, Cheng YL. Heat shock protein 27 regulates oxidative stress-induced apoptosis in cardiomyocytes: mechanisms via reactive oxygen species generation and Akt activation. *Chin Med J (Engl).* 2007 Dec 20;120(24):2271-7.

108. Lien YC, Lin SM, Nithipongvanitch R, Oberley TD, Noel T, Zhao Q, et al. Tumor necrosis factor receptor deficiency exacerbated Adriamycin-induced cardiomyocytes apoptosis: an insight into the Fas connection. *Mol Cancer Ther* 2006; 5: 261-269.
109. Tarzami ST, Miao W, Mani K, Lopez L, Factor SM, Berman JW, et al. Opposing effects mediated by the chemokine receptor CXCR2 on myocardial ischemia-reperfusion injury: recruitment of potentially damaging neutrophils and direct myocardial protection. *Circulation* 2003; 108: 2387-2392.
110. Nakamura Y, Yasuda T, Weisel RD, Li RK. Enhanced cell transplantation: preventing apoptosis increases cell survival and ventricular function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 291: H939-H947.
111. Wang R, Miura T, Harada N, Kametani R, Shibuya M, Fukagawa Y, et al. Pleiotropic effects of the beta- adrenoceptor blocker carvedilol on calcium regulation during oxidative stress-induced apoptosis in cardiomyocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 318: 45-52.
112. Kumar D and Jugdutt B.I. Apoptosis and oxidants in the heart *J Lab Clin Med* Volume 142, Number 5 November 2003
113. MacLellan WR, Schneider MD. Death by design. *Circ Res* 1997;81:137-44.
114. Haunstetter A, Izumo S. Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. *Circ Res* 1998;82:1111-29.
115. Ide T, Tsutsui H, Hayashidani S, et al. Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction. *Circ Res* 2001;88:529–35.
116. Berry CE, Hare JM. Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J Physiol* 2004;555:589–606.
117. Qin F, Shite J, Mao W, Liang C. Selegiline attenuates cardiac oxidative stress and apoptosis in heart failure: association with improvement of cardiac function. *Eur J Pharmacol* 2003;461: 149-58.
118. Moudgil R, Menon V, Xu Y, Musat-Marcu S, Kumar D, Jugdutt BI. Postischemic apoptosis and functional recovery after angiotensin II type 1 receptor blockade in isolated working rat hearts. *J Hypertension* 2001;19:1121-9.
119. von Harsdorf R, Li PF, Dietz R. Signaling pathways in reactive oxygen species-induced cardiomyocyte apoptosis. *Circulation*. 1999;**99**:2934–2941
120. Pimentel DR, et al. Reactive oxygen species mediate amplitude-dependent hypertrophic and apoptotic responses to mechanical stretch in cardiac myocytes. *Circ. Res.* 2001;**89**:453–460.
121. Adeghate E. Molecular and cellular basis of the aetiology and management of diabetic cardiomyopathy: a short review. *Mol. Cell. Biochem.* 2004;**261**:187–191.
122. Cesselli D, Jakoniuk I, Barlucchi L, Beltrami AP, Hintze TH, Nadal-Ginard B, Kajstura J, Leri A, Anversa P. Oxidative stress-mediated cardiac cell death is a major determinant of ventricular dysfunction and failure in dog dilated cardiomyopathy. *Circ Res.* 2001 Aug 3;**89**(3):279-86.

123. Prof. Simone Beninati, Dr. Alessandro Lentini. “Tecniche Istologiche”, dispense per il corso di “Biologia Umana”, Università di Roma Tor Vergata, Facoltà di Scienze MFN, Corso di Laurea Triennale in Biologia Umana. www.uniroma2.it/didattica/tecnistol/deposito/DISPENSE.doc

124. S.Pileri, M.T.Rivano. Compendio di immunoistochimica :Principi e metodi applicati alla microscopia ottica. Istituto di Anatomia ed Istologia Patologica Università degli Studi di Bologna Labometrics S.p.a.

125. Olli-P. Kallionemi, Urs Wagner, Juha Kononen and Guido Sauter. Tissue Microarray technology for high- throughput molecular profiling of cancer. Human Molecular Genetics, 2001, Vol. 10, No. 7

126. Mikiko Takikita, Joon-Yong Chung and Stephen M Hewitt. Tissue microarrays enabling high-throughput molecular pathology. Current Opinion in Biotechnology 2007, 18:318-325

127. Napoli C., Pignalosa O., de Nigris F.,Botti C., Rossi L., Mita L., Mansueto G., Somma P., De Rosa G., Sica V. Tissue microarray:un nuovo strumento di ricerca. Il Patologo Clinico n.7/8 del 2004 pag 272- 278.

Testi consultati

Cardiovascular Pathology

Virmani R., Atkinson J.B., Fenoglio J.J.
Vol. 23, Major Problems in Pathology
W.B. Saunders Company, 1991

Pathologic Basis of Disease

Robbins and Cotran
7th edition
Elsevier, 2005